



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Andrea Čačković

**BIOKEMIJSKI MEHANIZMI RAZGRADNJE
POLISAHARIDA U SLATKOVODNIM
EKOSUSTAVIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Sandi Orlić

Zagreb, 2025



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Andrea Čačković

THE BIOCHEMICAL MECHANISMS OF POLYSACCHARIDE DEGRADATION IN FRESHWATER ECOSYSTEMS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Sandi Orlić

Zagreb, 2025

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za procese taloženja, Zavoda za kemiju materijala na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Sandija Orlića, znanstvenog savjetnika, u okviru poslijediplomskog sveučilišnog (dokorskog) studija Kemije, smjer Biokemija, na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svom mentoru, dr. sc. Sandiju Orliću, na ukazanoj prilici, danom povjerenju i podršci tijekom izrade ove disertacije, kao i na povezivanju sa širom znanstvenom zajednicom.

My deepest gratitude goes to Dr. Greta Reintjes for her unconditional hospitality, generous support, and numerous inspiring discussions that greatly enriched both my research and personal experience.

Zahvaljujem suradnicima i kolegama iz Nacionalnog parka Plitvička jezera, Baćinskih jezera, Instituta Ruđer Bošković, Hrvatskog geološkog instituta, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Beču, Instituta Max Planck u Bremenu te Sveučilišta u Bremenu na suradnji, pomoći i podršci.

Hvala svim sadašnjim i bivšim članovima LPTa na ugodnoj i poticajnoj radnoj atmosferi te na pomoći tijekom cijelog procesa izrade disertacije.

Posebno hvala "Secret service" kolegama – Nives, Marti, Loreni, Maji i Dominiku – na svakom zajedničkom ručku, druženju i smijehu koji su svakodnevicu na poslu učinili lakšom i veselijom.

Najveća zahvala ide mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i osloncu.

Sadržaj

SAŽETAK	VIII
ABSTRACT	IX

§ 1. UVOD	1
1.1. Problemski okvir istraživanja.....	1
1.2. Cilj i sadržaj rada	3
§ 2. LITERATURNI PREGLED	6
2.1. Slatkovodni povezani ekosustavi	6
2.2. Mikroorganizmi slatkovodnih ekosustava	7
2.2.1. Prokariotske zajednice	8
2.2.2. Zajednice gljiva	9
2.2.3. Procesi sastavljanja zajednica	9
2.2.4. Mikrobna petlja	10
2.3. Otopljena organska tvar u slatkovodnim ekosustavima	11
2.3.1. Polisaharidi	13
2.3.2. Polisaharidi u slatkovodnim ekosustavima	14
2.4. Razgradnja polisaharida u vodenim ekosustavima	19
2.4.1. Mehanizmi razgradnje polisaharida	20
2.4.2. Dosadašnja istraživanja mehanizama razgradnje polisaharida u vodenim ekosustavima	21
2.5. Metode neovisne o kultivaciji	23
2.5.1. Sekvenciranje nove generacije	23
2.5.2. Fluorescentna in situ hibridizacija	27
2.6. Vizualizacija unosa ugljikohidrata pomoću fluorescentnih polisaharida	29
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	32
3.1. Prva faza istraživanja	32
3.1.1. Područje istraživanja i uzorkovanje.....	32
3.1.2. Mjerenje okolišnih parametara	34
3.1.3. Izolacija DNA, PCR umnažanje, sekvenciranje i bioinformatička obrada sekvenci	34
3.1.4. Statistička obrada podataka	36
3.2. Druga faza istraživanja.....	39

3.2.1. Područje istraživanja i uzorkovanje.....	39
3.2.2. Mjerenje okolišnih parametara	40
3.2.3. Priprema fluorescentno označenih polisaharida.....	40
3.2.4. Inkubacije s fluorescentno označenim polisaharidima	42
3.2.5. Izolacija DNA, PCR umnažanje, sekvenciranje i bioinformatička obrada sekvenci	42
3.2.6. Kvantifikacija aktivnosti sebičnog mehanizma.....	43
3.2.7. Fluorescentna in situ hibridizacija	43
3.2.8. Super-rezolucijsko oslikavanje sebičnog mehanizma unosa polisaharida u bakterija	44
3.2.9. Statistička obrada podataka.....	44
3.3. Treća faza istraživanja.....	47
3.3.1. Uzorkovanje, inkubacije s fluorescentno označenim polisaharidima i izolacija DNA	47
3.3.2. Metagenomsko sekvenciranje i bioinformatička obrada sekvenci.....	47
3.3.3. Funkcionalna anotacija MAG-ova.....	49
3.3.4. Statistička obrada podataka	50
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	52
4.1. Prva faza istraživanja	52
4.1.1. Okolišni parametri povezanog slatkovodnog ekosustava.....	52
4.1.2. Sastav mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu	55
4.1.3. Prostorno-vremenske promjene mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu..	61
4.1.4. Glavni pokretači formiranja mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu.....	63
4.1.5. Relativni utjecaj i kvantitativna analiza procesa sastavljanja mikrobnih zajednica između različitih godišnjih doba.....	65
4.1.6. Hidrokemijske i sezonski uvjetovane promjene mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu	67
4.1.7. Temeljni središnji mikrobiom slatkovodnog povezanog ekosustava	68
4.2. Druga faza istraživanja.....	76
4.2.1. Okolišni parametri jezera Kozjak i Crniševo	76
4.2.2. Fluktuacije ukupnog broja stanica u inkubacijama kroz različite sezone i jezera	77
4.2.3. Fluktuacije udjela razgradnje polisaharida sebičnim mehanizmom	78
4.2.4. Prostorno-vremenske promjene razgradnje autohtonih i alohtonih polisaharida sebičnim mehanizmom.....	81
4.2.5. Sastav mikrobnih zajednica u jezerima Kozjak i Crniševo.....	82
4.2.6. Odgovor bakterijskih zajednica na dodan FLAPS u inkubacije	84
4.2.7. Kvantifikacija brojnosti bakterija u FLAPS inkubacijama temeljena na FISH analizi	89
4.2.8. Identifikacija sebičnih bakterija pomoću FISH-a i sekvenciranja.....	91

4.2.9. Prostorno-vremenske razlike bakterijskih zajednica s predviđanjem sebično aktivnih bakterija u slatkovodnim jezerima.....	96
4.3. Treća faza istraživanja.....	101
4.3.1. Taksonomska raznolikost metagenomskih sekvenci u različitim jezerima, sezonama i uvjetima inkubacija.....	101
4.3.2. Razlike u broju CAZymes gena između različitih jezera, sezona i uvjeta inkubacija	107
4.3.3. CAZymes geni identificirani u različitim jezerima, sezonama i uvjetima inkubacije.....	109
4.3.4. Identifikacija bakterija povezanih s genima za razgradnju polisaharida	114
4.3.5. Metagenomski uvid u bakterijsku raznolikost slatkovodnih jezerskih ekosustava	120
4.3.6. Sezonske i prostorne varijacije gena koji kodiraju CAZymes u oligotrofnom i mezotrofnom jezeru.....	121
4.3.7. Struktura i povezanost CAZy gena s polisaharidima i bakterijskim rodovima.....	123
§ 5. ZAKLJUČAK.....	125
§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (PREMA POTREBI)	127
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	129
§ 8. DODATAK.....	XVIII
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXXIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

BIOKEMIJSKI MEHANIZMI RAZGRADNJE POLISAHARIDA U SLATKOVODNIM EKOSUSTAVIMA

Andrea Čačković

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Grad Zagreb, Republika Hrvatska

Slatkovodni ekosustavi imaju ključnu ulogu u globalnom ciklusu ugljika, pri čemu bakterije razgrađuju polisaharide kroz mehanizme kolaboracije, oportunizma i sebičnosti. Utjecaj okolišnih čimbenika na strukturu mikrobnih zajednica istražen je prostorno-vremenskom analizom pomoću visoko protočnog sekvenciranja DNA. Mehanizmi razgradnje polisaharida praćeni su inkubacijama s fluorescentno označenim polisaharidima, dok su ključne bakterijske skupine identificirane kombinacijom sekvenciranja i fluorescencijske *in situ* hibridizacije. Sekvenciranjem metagenoma dodatno su otkriveni prostorno i sezonski specifični geni za razgradnju ispitanih polisaharida. Rezultati su pokazali da mikrobne zajednice slatkovodnog povezanog ekosustava, unatoč sezonskim promjenama, zadržavaju stabilnost kroz temeljni središnji mikrobiom. Dokazana je i prisutnost sebičnog mehanizma razgradnje polisaharida, s varijacijama između jezera različitih trofičkih stanja i sezona. Bakterije iz koljena Bacteroidota, Planctomycetota, Proteobacteria i Verrucomicrobiota odgovorne su za razgradnju polisaharida. Ova disertacija produbljuje razumijevanje uloge mikrobnih zajednica u razgradnji polisaharida, ključnih za kruženje ugljika unutar slatkovodnih ekosustava.

(142 stranice, 58 slika, 4 tablice, 255 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: slatkovodni ekosustav / mikrobne zajednice / razgradnja polisaharida / sebični mehanizam

Mentor: dr. sc. Sandi Orlić, znanstveni savjetnik

Rad prihvaćen: 4.6.2025.

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Aleksandra Maršavelski
2. izv. prof. dr. sc. Igor Stuparević
3. dr. sc. Jelena Godrijan, v. zn. sur.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

THE BIOCHEMICAL MECHANISMS OF POLYSACCHARIDE DEGRADATION IN FRESHWATER ECOSYSTEMS

Andrea Čačković

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Croatia

Freshwater ecosystems play a key role in the global carbon cycle, where bacteria degrade polysaccharides through sharing, scavenging and selfish mechanisms. Environmental influence on microbial community structures was investigated through spatiotemporal analysis using high-throughput DNA sequencing. Polysaccharide degradation mechanisms were tracked using fluorescently labelled polysaccharides incubations, while bacteria involved were identified through a combination of sequencing and fluorescence *in situ* hybridization. Metagenomic sequencing revealed spatially and seasonally specific genes responsible for the polysaccharide degradation. The results revealed stable microbial communities in the freshwater network ecosystem through core microbiome, despite seasonal variations. Polysaccharide degradation thorough selfish mechanism among bacteria was proven, varying across lakes with different trophic states and seasons. Bacteria from the phyla Bacteroidota, Planctomycetota, Proteobacteria, and Verrucomicrobiota were identified as key polysaccharide degraders. This dissertation advances understanding of microbial role in polysaccharide degradation, an essential process for carbon cycling within freshwater ecosystem.

(142 pages, 58 figures, 4 tables, 255 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: freshwater ecosystem/ microbial communities/ polysaccharide degradation/ selfish uptake

Supervisor: Dr. Sandi Orlić, Senior scientist

Thesis accepted: 4.6.2025.

Reviewers:

Dr. Aleksandra Maršavelski, Associate Professor
Dr. Igor Stuparević, Associate Professor
Dr. Jelena Godrijan, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

1.1. Problemski okvir istraživanja

Slatkovodni ekosustavi imaju nesrazmjerno velik utjecaj na globalni ciklus ugljika, jer posreduju u prijenosu ugljika s kopna u atmosferu te doprinose njegovom zadržavanju zakopavanjem u sedimentima. U vodenim ekosustavima organski ugljik uglavnom je prisutan kao otopljena organska tvar, čija koncentracija ovisi o trofičkom stanju okoliša. Polisaharidi čine 5–30 % organske tvari u slatkovodnim sustavima, a njihov sastav i podrijetlo variraju. Autohtoni polisaharidi nastaju lokalnim autotrofnim i heterotrofnim aktivnostima u vodenim sustavima, djelovanjem mikroorganizama i algi, razgradnjom vodenih biljaka i ispuštanjem sedimenata [1]. S druge strane, alohtoni polisaharidi kopnenog su podrijetla, dolaze ispiranjem tla i površinskim otjecanjem te uglavnom potječu od biljaka [2].

Bakterije su glavni razlagači organske tvari u vodenim ekosustavima, gdje kao konzumenti i remineralizatori otopljene organske tvari koriste polisaharide kao ključne metaboličke supstrate [3]. Zbog složene polimerne strukture, polisaharidi se teško razgrađuju, pa heterotrofne bakterije izlučuju specifične izvanstanične enzime koji ih razgrađuju u monomerne jedinice korisne za metabolizam [4]. Ovi enzimi, poznati kao CAZymes (engl. *carbohydrate-active enzymes*, CAZymes), sudjeluju u razgradnji, sintezi i vezanju složenih ugljikohidrata te su visoko specifični za određene glikozidne veze. Među njima, glikozidne hidrolaze (engl. *glycoside hydrolases*, GH) kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza, glikoziltransferaze (engl. *glycosyltransferases*, GT) kataliziraju biosintezu glikozidne veze, polisaharidne liaze (engl. *polysaccharide lyases*, PL) cijepaju polisaharide s uronskom kiselinom mehanizmom β -eliminacije, dok ugljikohidratne esteraze (engl. *carbohydrate esterases*, CE) uklanjaju esterske modifikacije kako bi olakšale djelovanje GH. Uz njih, moduli vezanja ugljikohidrata (engl. *carbohydrate-binding modules*, CBM) povećavaju aktivnost drugih enzima, dok pomoćne aktivnosti (engl. *auxiliary activities*, AA) uključuju enzime za razgradnju lignina [5,6]. Složeni polisaharidi sadrže brojne različite glikozidne veze i za njihovu uspješnu razgradnju sve glikozidne veze moraju se cijepati određenim redoslijedom, što u većini slučajeva zahtijeva sinergiju različitih enzima. Budući da je proizvodnja ovih enzima energetski zahtjevna, bakterije nadoknađuju potrošenu energiju iskorištavanjem oslobođenih monosaharida [7].

U vodenim ekosustavima bakterije razgrađuju polisaharide putem tri različita mehanizma [8]. Prvi mehanizam provode takozvane „kolaborativne bakterije“ (engl. *sharing bacteria*), koje proizvode i izlučuju površinski vezane ili slobodne izvanstanične enzime za razgradnju polisaharida u monosaharide. Ti se monosaharidi zatim otpuštaju u okoliš, gdje ih mogu iskoristiti iste bakterije koje su ih proizvele, ili bakterije uključene u drugi mehanizam, „oportunističke bakterije“ (engl. *scavenging bacteria*), koje same ne proizvode izvanstanične enzime, već iskorištavaju tuđe proizvode. Zbog toga bakterije koje proizvode enzime ne ostvaruju punu korist od vlastite aktivnosti [6]. Oba mehanizma oslanjaju se na vanjsku hidrolizu polisaharida.

Treći mehanizam, izvorno opisan u crijevnom mikrobiomu [9], karakterističan je za „sebične bakterije“ (engl. *selfish bacteria*). One također proizvode izvanstanične enzime, koji se prijanjaju na površinu njihovih stanica, gdje polisaharide vežu za staničnu membranu i djelomično ih hidroliziraju u oligosaharide. Oligosaharidi se zatim transportiraju u periplazmu, gdje se konačno razgrađuju do monosaharida. Ovaj mehanizam omogućuje sebičnim bakterijama da minimiziraju gubitke proizvoda hidrolize i učinkovitije nadoknade resurse utrošene na proizvodnju enzima [9].

Sebična razgradnja polisaharida na različitim lokacijama, u različitim sezonama i kod različitih vrsta polisaharida detaljno je istražena u morskom ekosustavu [8,10–12]. Ovaj mehanizam dominira u oligotrofnim područjima, poput dubokog oceana i morskih vrtloga [13], te je najizraženiji u ranim fazama cvjetanja fitoplanktona, dok kako cvjetanje napreduje, dolazi do prevalencije vanjske hidrolize [11]. U slatkovodnim ekosustavima istraživanja su se fokusirala samo na vanjsku hidrolizu [14], čija je veća aktivnost zabilježena u jezerima višeg trofičkog stanja, osobito tijekom proljetnog cvata fitoplanktona.

Sebični mehanizam ima ključnu ulogu u razgradnji bakterijskih polisaharida u morskom okolišu, odgovoran je za 25% do 60% bakterijske aktivnosti za hidrolizu polisaharida. Ipak, detaljno razumijevanje uloge sebičnog mehanizma razgradnje i unosa polisaharida iz alohtonih u odnosu na autohtone izvore u slatkovodnim jezerima ostaje nedovoljno istraženo. To uključuje razumijevanje doprinosa različitih mehanizama razgradnje polisaharida tijekom vremena (rane naspram kasne faze cvatnje) i u različitim tipovima jezera (oligotrofna naspram mezotrofna). Za cjelovito razumijevanje iskorištavanja polisaharida u jezerskim sustavima, važno je proučiti sezonske i prostorne varijacije te utjecaj porijekla polisaharida. Posebno je važno ispitati kako lotički sustavi (potoci i rijeke), koji dobivaju organske tvari površinskim

otjecanjem s tla, biogeokemijski utječu na nizvodne lentičke sustave (jezera), kroz koje voda prolazi i u kojima se nakupljaju i transformiraju unesene tvari. U tim povezanim slatkovodnim ekosustavima, svaki sustav djeluje istovremeno kao primatelj i izvor mikrobnih zajednica, hranjivih i organskih tvari. Funkcioniranje cijelog ekosustava oblikuju i vanjsko opterećenje te međusobna povezanost unutar sliva.

1.2. Cilj i sadržaj rada

Ciljevi ove disertacije uključuju utvrđivanje prostorno-vremenske razlike u mikrobnim zajednicama između različitih tipova vodotoka unutar slivnog područja slatkovodnog povezanog ekosustava. Nadalje, cilj je istražiti prisutnost i varijacije sebičnog mehanizama u razgradnji polisaharida od strane bakterija u slatkovodnom ekosustavu kroz analizu aktivnosti izvanstaničnih enzima i raznolikost mikrobnih zajednica tijekom inkubacija s različitim fluorescentno označenim polisaharidima. Analizom cjelokupne mikrobne zajednice definirati će se bakterije odgovorne za razgradnju polisaharida različitim mehanizmima u slatkovodnim ekosustavima. Formulirane su slijedeće hipoteze: (1) Mikrobne zajednice će pokazati različite strukture i sastave između različitih tipova vodotoka i sezona, s većom raznolikošću i specifičnim sastavom u pritocima u usporedbi s međujezerskim tokovima; (2) Prisutnost sebičnog mehanizma u slatkovodnom ekosustavu ovisit će o trofičkom stanju sustava i sezonskim promjenama. Jezera višeg trofičkog stanja i u vrijeme fitoplanktonskog cvata pokazat će veću razgradnju polisaharida sebičnim mehanizmom; (3) Metagenomska struktura enzima odgovornih za razgradnju polisaharida ovisit će o izvoru istog u istraživanim uvjetima. Različite bakterijske vrste bit će odgovorne za razgradnju polisaharida u slatkovodnim ekosustavima, a njihova aktivnost razlikovat će se na prostorno-vremenskoj skali i ovisno o polisaharidu.

Disertacija je podijeljena u nekoliko međusobno povezanih cjelina. U Literaturnom pregledu definirani su osnovni pojmovi vezani uz mikrobne zajednice slatkovodnih ekosustava i otoplenu organsku tvar u njima. Također je opisana razgradnja polisaharida od strane bakterija u slatkovodnim ekosustavima, a detaljno su opisani različiti mehanizmi razgradnje polisaharida od bakterija i istraživanja vezana uz njih u morskom okolišu. Također je dan pregled metoda neovisnih o kultivaciji koje su korištene u izradi ove doktorske disertacije.

Poseban naglasak stavljen je na metodu inkubacija s fluorescentno označenim polisaharidima, koja je bila ključna za razumijevanje tri različita mehanizma razgradnje polisaharida.

Istraživanje, odnosno Eksperimentalni dio i Rezultati i Rasprava su podijeljeni u tri faze, od kojih su prve dvije faze objavljene kao samostalni znanstveni radovi.

Prva faza istraživanja uključuje praćenje mikrobnih zajednica i okolišnih parametara slatkovodnog povezanog ekosustava u različitim godišnjim dobima. Uzorkovanje vode i *in situ* mjerenje okolišnih parametara provedeno je na 25 točaka unutar slivnog područja Plitvičkih jezera tijekom 2 godine. Uzorkovana voda korištena je za određivanje ionskog sastava i otopljenog organskog ugljika, isto kao i za istraživanje mikrobnih zajednica, sekvenciranjem amplikona 16S rRNA prokariotskih gena i ITS gljivičnih gena.

U drugoj fazi istražena je prisutnost sebičnog mehanizma prilikom razgradnje polisaharida od strane bakterija u slatkovodnim ekosustavima. Istraživanje je provedeno u uzorcima prikupljenima iz dva različita jezera tijekom tri godišnja doba. Uzorkovana jezera razlikuju se prema trofičkom stanju, klimatskim i okolišnim uvjetima. Jezero Kozjak je oligotrofno jezero u kontinentalnoj regiji, a jezero Crniševo je mezotrofno jezero u mediteranskoj regiji Hrvatske s dotokom slane morske vode. Okolišni uvjeti jezera definirani su mjerenjem okolišnih parametara *in situ* i ionskog sastava. Uzorkovana voda inkubirana je s jednim od šest fluorescentno označenih polisaharida (arabinogalaktan, hondroitin sulfat, fukoidan, laminarin, pululan ili ksilan) 18 dana, u mraku i *in situ* temperaturi. Svaki 3 ili 6 dana uzimani su poduzorci inkubacija za analizu mikrobnih zajednica sekvenciranjem amplikona 16S rRNA gena, te za vizualizaciju prisutnosti sebičnog mehanizma, bojanjem nukleinske kiseline i fluorescentnom *in situ* hibridizacijom.

Treća faza istraživanja uključuje analizu cjelokupne mikrobne zajednice. Na temelju rezultata druge faze istraživanja, odabrano je ukupno 25 uzoraka koji su imali najviše postotke sebičnog mehanizma detektiranog kod bakterija. Odabrani uzorci su uključivali uzorke iz inkubacija s pululanom i ksilanom iz Kozjaka i Crniševa, kao i iz ljetnih inkubacija sa svim polisaharidima iz Crniševa. Metagenomskim sekvenciranjem čitave okolišne DNA iz uzoraka analiziran je cjelokupan sastav bakterijskih zajednica u inkubacijama s različitim polisaharidima. Također su u različitim inkubacijama identificirani geni za razgradnju polisaharida, te su identificirane bakterije sa spomenutim genima koje sudjeluju u razgradnji polisaharida.

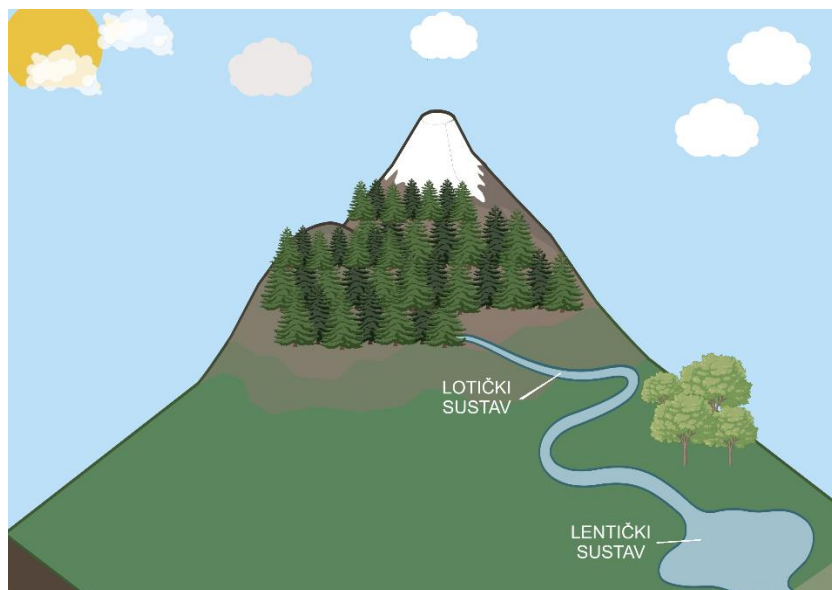
U Zaključku je prikazan kratki osvrt na dobivene rezultate te su dani zaključci o ekološkim i mikrobnim razlikama između različitih tipova potoka i sezona uzorkovanja unutar slatkovodnog povezanog ekosustava, o prisutnosti sebičnog mehanizma unosa i prostorno-sezonskim razlikama iskorištavanja polisaharida u slatkovodnim ekosustavima.

Istraživanje provedeno u okviru ove doktorske disertacije pruža nove spoznaje o mikrobnim procesima razgradnje bitnih organskih komponenti u složenim slatkovodnim ekosustavima. Analize mikrobne raznolikosti, popraćene istraživanjem različitim mehanizama razgradnje polisaharida, pokazale su da ključnu ulogu u održavanju ekološke ravnoteže imaju specifične skupine mikroorganizama i njihova metabolička aktivnost. Zbog toga je sustavno istraživanje mikrobnih zajednica i njihovih mehanizama razgradnje, provedeno u okviru ove disertacije, od velike važnosti za razumijevanje dinamike kruženja organskih tvari u slatkovodnim ekosustavima i čimbenika koji na nju utječu. Ovo istraživanje predstavlja temelj za daljnja istraživanja ekoloških funkcija mikroorganizama te njihov potencijal za primjene u bioremedijaciji i očuvanju vodnih resursa.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Slatkovodni povezani ekosustavi

Slatkovodni povezani ekosustavi sastoje se od različitih vodenih sustava povezanih unutar istog vodenog sliva. Slatkovodne povezane ekosustave čine lotički sustavi, poput potoka i rijeka, te lentički sustavi, poput jezera (Slika 1). Interakcije između različitih vodenih sustava unutar istog povezanog ekosustava utječu na njihovo pojedinačno funkcioniranje [1]. Potoci i rijeke primarni su primatelji hranjivih i organskih tvari ne samo iz tla i površinskog otjecanja [2], već i iz podzemnih voda [1], ali i iz antropogenih točkastih izvora [3]. Tekući nizvodno voda iz potoka i rijeka ulijeva se u jezera i pritom prolazi kroz značajne hidrološke promjene. Na primjer, delta jezera mogu oblikovati konveksne bočne površine [4], koje potom vodu iz jezera usmjeravaju iz glavnog potoka prema podzemnim slojevima ili prema površinskim distributivnim kanalima [5]. Isto tako, temperaturne razlike vode između potoka i jezera mogu biti prilično izražene, pogotovo u planinskim ekosustavima [6], gdje se potoci nalaze u šumovitim i sjenovitim dijelovima. Hidrološke promjene koje su posljedica interakcije potok-jezero imaju utjecaj na organizme, među ostalim i mikroorganizme unutar vodenih sustava, te i na biogeokemijske procese u kojima posreduju. Na primjer, jezera mogu transformirati i pohraniti velike dijelove hranjivih tvari koji u njih ulaze proizvodnjom organskih čestica i sedimentacijom i/ili denitrifikacijom [7]. Isto tako, jezera mogu promijeniti anorganske hranjive tvari u organske tvari, a s time promijene otopljene i/ili čestične organske tvari u potocima jer oni izlaze iz jezera [8]. Jezera imaju dulje vrijeme zadržavanja vode i stoga djeluju kao „ekološki“ puferi jer ublažavaju vremenske varijacije i reguliraju protok materijala [6]. Ovime reguliraju, odnosno stabiliziraju koncentraciju hranjivih i organskih tvari u nizvodnim tokovima, potocima, što doprinosi održavanju ekološke stabilnosti cijelog ekosustava tijekom vegetacijske sezone. Stoga, u povezanim slatkovodnim ekosustavima svaki vodeni sustav u isto je vrijeme i primatelj i izvor hranjivih i organskih tvari.



Slika 1. Skica slatkovodnog povezanog ekosustava (Izvor: vlastita izrada u Biorender.com).

2.2. Mikroorganizmi slatkovodnih ekosustava

Unutar slatkovodnih povezanih ekosustava protok vode kroz cijeli sustav uvelike utječe na sastav mikrobnih zajednica [15]. Mikrobne zajednice, zajedno s hranjivim tvarima, mogu biti unesene iz drugih ekosustava u potoke, a zatim zbog protoka vode iste dopijevaju do jezera. Opisani proces naziva se masivna advekcija mikroorganizama iz drugih sustava u potoke, te do jezera [16]. Dolaskom mikroorganizama do jezera, oni padaju pod utjecaju lokalnih hidroloških i geokemijskih uvjeta koji utječu na njihov opstanak i razmnožavanje, te time i prisutnost. U jezerima, okolišni uvjeti su drugačiji nego u potocima što uzrokuje prirodnu selekciju u mikrobnim zajednicama. Lokalni mikroorganizmi u jezerima prilagođeni su specifičnim uvjetima koji vladaju i stoga najčešće nadvladaju mikroorganizme donesene iz potoka putem procesa "okolinski odabir" i "sortiranje vrsta" [17]. Odnosno, mikroorganizmi iz drugih izvora ne moraju nužno opstati u jezerima ako se ne mogu natjecati s lokalnim, bolje prilagođenim vrstama. Dakle, hidrologija, odnosno brzina protoka vode, položaj sustava unutar ekosustava te lokalni okolišni uvjeti, poput temperature vode i koncentracije hranjivih tvari, zajedno s procesima okupljanja mikrobnih zajednica [18] imaju ključnu ulogu u oblikovanju mikrobnih zajednica u slatkovodnim povezanim ekosustavima. Drugim riječima, interakcija između dinamike vode i specifičnih uvjeta u različitim dijelovima ekosustava rezultira time da različiti

mikroorganizmi prevladavaju u različitim dijelovima slatkovodnih povezanih ekosustava, poput potoka i jezera.

2.2.1. Prokariotske zajednice

Prokarioti su slobodnoživući jednostanični organizmi mikroskopske veličine koji rastu i razmnožavaju se u odgovarajućim uvjetima okoliša i nutrijenata. Njihova glavna karakteristika je odsutnost jezgre odvojene membranom. Prokarioti se dijele u dvije domene: arheje i bakterije.

Slatkovodni mikroorganizmi vrlo su brojni i obuhvaćaju ogromnu genetsku raznolikost, tako jedan mililitar jezerske vode sadrži približno 10^6 prokariotskih stanica te nekoliko tisuća različitih mikrobnih genotipova [19]. Prokarioti nastanjuju gotovo sve zone jezera, uključujući bental i pelagijal, te sedimente ili na površinama i unutar drugih organizama poput biljaka, životinja i protista.

U pelagičnom dijelu jezera mikroorganizmi mogu živjeti slobodno plutajući (planktonski) ili vezani uz čestice. Mnogi od njih sposobni su mijenjati način života ovisno o uvjetima [20]. Rast prokariota ograničen je dostupnošću resursa poput nutrijenata te fizičkim čimbenicima, kao što su temperatura, pH, koncentracija kisika i svjetlost, ali i ispašom od strane predatora i lizom virusa. Ovi čimbenici u jezerima se isprepliću i stvaraju složene *in situ* interakcije [21].

Svi mikroorganizmi ovise o ograničenim resursima otopljene organske tvari (engl. *dissolved organic matter*, DOM) [22], koji se sastoji od različitih spojeva. Ključne komponente koje podržavaju rast mikroba uključuju jednostavne mono- i oligomere, poput aminokiselina, ugljikohidrata i karboksilnih kiselina, koje su prisutne u vrlo niskim koncentracijama (nM razina) u prirodnoj jezerskoj vodi. Koncentracije navedenih tvari se izmjenjuju velikom brzinom [22].

Bioraznolikost mikrobnih zajednica u jezerima iznimno je velika, no većina vrsta još uvijek nema kultiviranih predstavnika [23]. Najčešće zastupljene skupine slatkovodnih prokariota uključuju koljena Actinobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes (Flavobacteriales i Sphingobacteriales), Cyanobacteria, Verrucomicrobia i Thaumarchaeota. Uz ove dominantne skupine, prisutni su i drugi prokarioti u manjim ili povremenim količinama, poput Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetes, Spirochaetes, te nekultiviranih vrsta kao što su BRC1, OD1, OP10, SR1 i TM7.

2.2.2. Zajednice gljiva

Gljive su eukariotski organizmi sa staničnom stijenkom građenom od hitina te heterotrofnim načinom prehrane. Gljive su filogenetski i funkcionalno raznolika skupina prisutna u gotovo svim ekosustavima na Zemlji, uključujući vodene ekosustave [24]. Gljive kroz parazitske interakcije s drugim organizmima i organskom tvari mogle bi uvelike utjecati na strukturu, stabilnost i funkcionalnost hranidbenog lanca u vodenim sustavima [25]. Upravo zato treba proširiti saznanja o raznolikosti i ekologiji vodenih gljiva kako bi se bolje razumjeli mehanizmi povratnih informacija ekosustava na klimu i antropogene promjene [26].

Zajednica gljiva vodenih okoliša morfološki, filogenetski i ekološki je raznolika skupina [27]. Paralelno s njihov raznolikim načinom života, sastav zajednice i brojnost gljiva znatno se razlikuju ovisno o njihovim vodenim staništima [28]. Broj izoliranih i opisanih svojti gljiva mnogo je manji od globalnih procjena, uključujući samo 120.000–143.273 vrsta [24]. Većina vrsta povezana je s dva koljena Ascomycota i Basidiomycota.

Uz potpuno prilagođene vodene gljive, koje koriste dostupne hranjive tvari i razmnožavaju se u vodi, u vodenim ekosustavima nalaze se i kopnene gljive i djelomično prilagođene vodene gljive. Kopnene gljive pasivno se unose u vodeni ekosustav i u vodi ne pokazuju nikakvu aktivnost [29], a djelomično prilagođene gljive mogu biti amfibijske s jednom fazom svog životnog ciklusa pod vodom, a drugom fazom raspršenom na granicama zrak-voda.

Napredak tehnologija sekvenciranja potaknuo je novi val u istraživanju zajednice gljiva vodenih sustava [24]. Tako je nedavno otkrivena nova velika raznolikost gljiva u vodenim ekosustavima, gljive tamne tvari (engl. *dark matter fungi*) koje se povezuje s ranim granama gljivičnog stabla, tj. Aphelida, Rozellomycota i Chytridiomycota [26].

2.2.3. Procesi sastavljanja zajednica

Iz makro ekoloških studija definirane su četiri različite temeljne kategorije sastavljanja zajednica: selekcija među vrstama, rasprostranjenost, specijacija i ekološki drift [30]. Ove kategorije su oblikovane determinističkim ili stohastičkim procesima sastavljanja zajednica [31]. Ti se procesi međusobno ne isključuju, a njihova relativna važnost mijenja mikrobnu raznolikost i njezinu biološku funkciju [32].

U determinističkim procesima sastavljanja zajednica abiotički i biotički parametri određuju prisutnost ili odsutnost vrsta te relativnu brojnost vrsta [33], odnosno deterministički procesi uključuju okolišnu selekciju i interakciju među vrstama [34]. Dok se stohastičkim procesima

sastavljanja zajednica smatraju nasumična kolonizacija, demografske slučajnosti i nasumične promjene u relativnoj brojnosti vrsta (ekološki drift) koje nisu posljedica okolišnih uvjeta [35]. Iako je sastavljanje mikrobnih zajednica većim dijelom proučavano iz determinističke perspektive i gdje je dokazano da određeni okolišni parametri poput pH, saliniteta i organskog ugljika utječu na njihov sastav, sve veći broj istraživanja pokazao je kako i stohastički procesi utječu na njihov sastav [33].

Unutar vodenih povezanih ekosustava mikrobna zajednica nastaje kao rezultat procesa sastavljanja uzvodno zbog hidroloških uvjeta u svakom od podsustava (jezera, potoci) [36], a promjene u sastavu nisu toliko obilježene prisutnošću ili odsutnošću vrsta, već promjenama u relativnoj zastupljenosti [17]. Strukturu mikrobnih zajednice, a time i povezanost slatkovodnih ekosustava, dodatno oblikuju sezonske hidrološke promjene [37,38]. Stoga su prostorno-vremenske studije posebno važne za detaljnije razumijevanje funkcioniranja slatkovodnih povezanih ekosustava. Glavni razlog za funkcioniranje takvih povezanih ekosustava vjerojatno je postojanje temeljnog središnjeg mikrobioma [17,39,40].

2.2.4. Mikrobna petlja

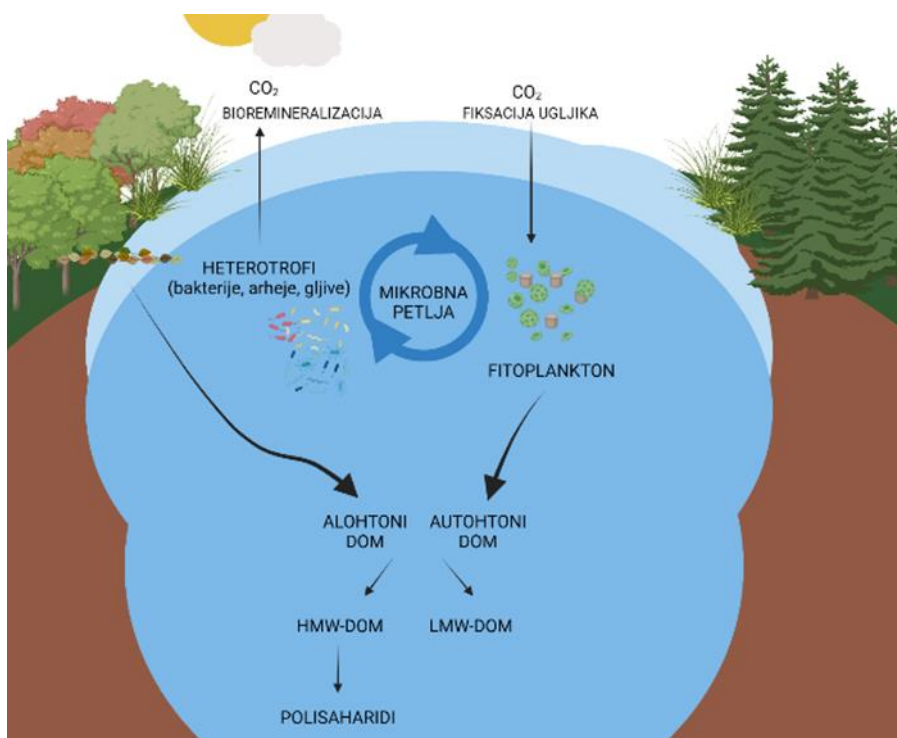
U vodenim ekosustavima organizmi su podijeljeni u tri skupine, autotrofne, miksotrofne i heterotrofne [41]. Autotrofni organizmi fiksiraju svjetlosnu energiju i koriste je za sintezu složenih organskih tvari iz jednostavnih anorganskih tvari u procesu primarne proizvodnje. U ove organizme iz fitoplanktonske zajednice ubrajaju se alge (mikrofiti), te iz makrobentoske zajednice, biljke (makrofiti) [42].

Heterotrofni organizmi ne mogu sintetizirati organske tvari, stoga moraju koristiti gotovu organsku tvar proizvedenu od autotrofa. Koriste jednostavnu i složenu organsku tvar koje metabolizmom, odnosno sekundarnom produkcijom resintetiziraju. U heterotrofe se ubrajaju bakterije, arheje, gljive i neki protisti, koji svojom izvanstaničnom enzimatskom aktivnošću započinju degradaciju organske tvari [42].

Miksotrofni organizmi kombiniraju autotrofni i heterotrofni način prehrane te su široko rasprostranjeni među mikroorganizmima, uključujući važne skupine planktona poput dinoflagelata i cijanobakterija [43].

Autotrofi proizvode organsku tvar koju heterotrofi koriste kao izvor energije, pokrećući mikrobnu petlju (Slika 2; engl. *microbial loop*) [44]. Heterotrofni mikroorganizmi konzumiraju organsku tvar, a njih zatim jedu heterotrofni protisti, koji dalje služe kao hrana

mikrozooplanktonu i višim trofičkim razinama. Tako, mikroba petlja omogućuje recikliranje organske tvari i njeno uključivanje u hranidbenu mrežu, omogućujući kruženje hranjivih tvari u vodenim ekosustavima.



Slika 2. Shematski prikaz mikrobne petlje u slatkovodnom ekosustavu (izvor: vlastita izrada u Biorender.com).

2.3. Otopljeni organska tvar u slatkovodnim ekosustavima

U slatkovodnim ekosustavima organski ugljik najvećim dijelom dio je otopljene organske tvari (engl. *dissolved organic matter*, DOM) [45]. Osim organskog ugljika, koji se sastoji od organskih tvari koje sadrže ugljik, DOM čine i otopljeni dušikovi spojevi, huminske i fulvinske kiseline, lipidi i masne kiseline, ugljikohidrati i pigmenti [46]. Otopljeni dušikovi spojevi uključuju organske molekule koje sadrže dušik. Huminske i fulvinske kiseline su kompleksne organske tvari koje nastaju razgradnjom biljnih i životinjskih ostataka, lipidi, masne kiseline i ugljikohidrati većinski potječu od algi, biljaka i drugih organizama, te pigmenti kao što su klorofil i karotenoidi, koji potječu iz fotosintetskih organizama.

DOM je važan u prirodnim vodenim ekosustavima zbog niza procesa u kojima sudjeluje, među ostalim regulaciji hranjivih tvari i pH vrijednosti. Također, djeluje kao jak kelirajući agens za metale utječući na njihovu topljivost, transport i toksičnost, te sudjeluje u prijenosu organskih onečišćujućih tvari, formiranju koloidnih čestica i fotokemijskim reakcijama [47]. Stoga je DOM, pogotovo u povezanim ekosustavima, središnji za mnoge procese od biogeokemijskih ciklusa do dinamike hranidbene mreže i funkcioniranja ekosustava.

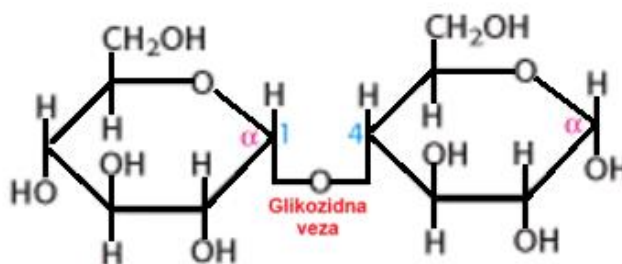
DOM se prema veličini može podijeliti u dvije kategorije (Slika 2), točnije u spojeve visoke molekulske mase (engl. *high molecular weight*, HMW; > 1000 Da) i spojeve niske molekulske mase (engl. *low molecular weight*, LMW; < 1000 Da) [48].

Izvori otopljene organske tvari u slatkovodnim sustavima mogu biti alohtoni ili autohtoni (Slika 2). Alohtoni DOM proizveden je izvan vodenog sustava i transportiran u njega. Najvećim dijelom je kopnenog podrijetla, odnosno nastaje degradacijom biljaka u tlu. U vodene sustave unosi se ispiranjem tla ili površinskim otjecanjem zbog kišnih padalina [49], ali i prilikom otapanja snijega i leda [50]. Autohtoni DOM proizveden je unutar vodenog sustava od strane alga i makrofita kroz mikrobnu hranidbenu mrežu [1]. Fitoplankton, koji većinski čine alge, proizvodi DOM primarnom proizvodnjom otpuštanjem istog iz živih ili mrtvih stanica [1]. Fragmenti stanica i otopljena tvar iz njih u okolnu vodu oslobađaju se prilikom lize stanica i algi i bakterija, te se DOM također oslobađa otapanjem tonućeg detritusa, tj. neživog čestičnog organskog materijala [1]. Prisutnost alohtone ili autohtone frakcije DOM-a varira ovisno o sezoni, lokaciji i trofičkom stanju vodenog sustava.

S obzirom na količinu otopljenih organskih i anorganskih tvari u vodenim ekosustavima, razlikuje se trofičko stanje tih ekosustava [51]. Topljivost tvari u vodenom ekosustavu definira njegovo trofičko stanje, odnosno oligotrofiju, mezotrofiju, eutrofiju i hipertrofiju. Povećan antropogeni pritisak utječe na sastav otopljene organske tvari u vodenim sustavima jer dolazi do povećane kontaminacije voda kroz otpadne vode. Tako se eutrofikacija vodenih ekosustava događa zbog poremećaja razgradnje organske tvari, odnosno poremećaja ravnoteže u mikrobnj petlji [52]. Povećan unos alohtonih organskih tvari, koje su razgradljive, dovodi do većeg razvoja heterotrofa koji se njima hrane, kao što su bakterije i gljivice. Koncentracija DOM-a u prirodnim vodama ovisi o trofičkom stanju vodenog okoliša i varira od 1 mg C/L u oligotrofnim okolišima do 50 mg C/L u visoko eutrofnim okolišima [53].

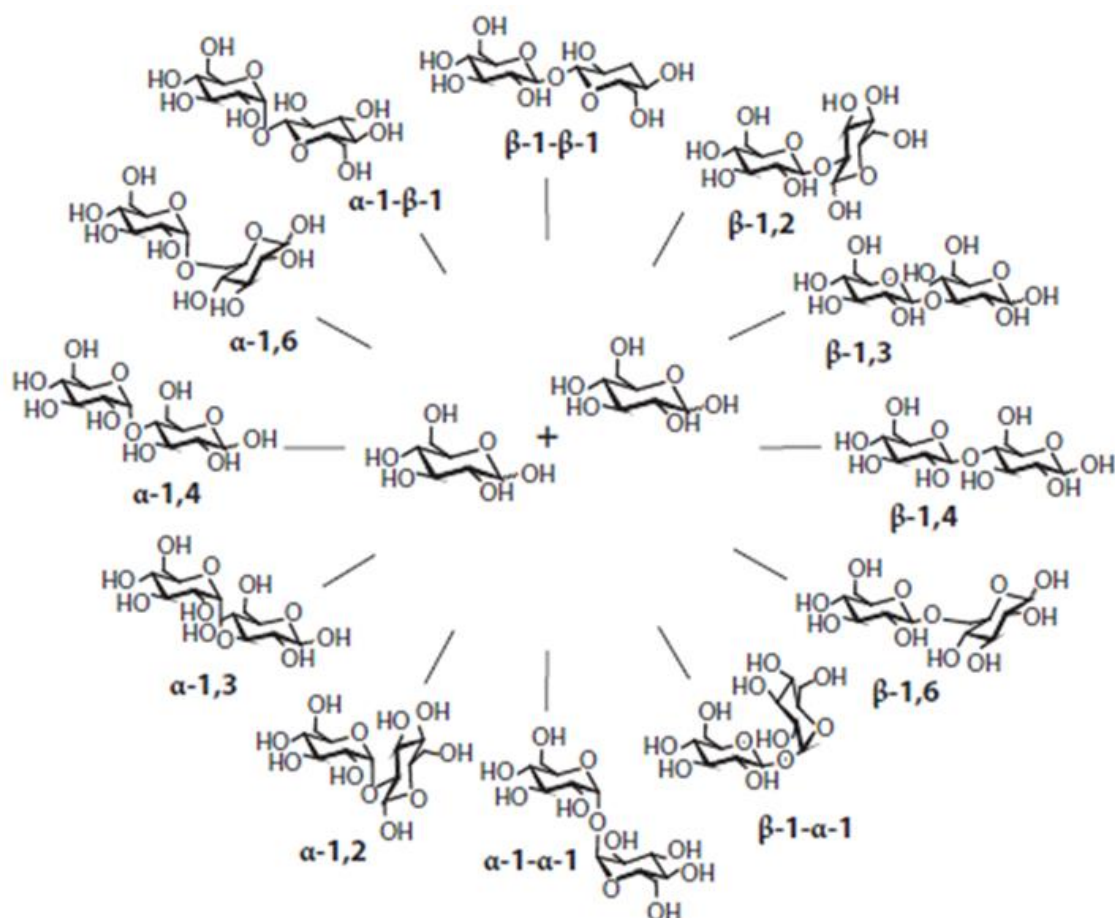
2.3.1. Polisaharidi

Ugljikohidrati su jedna od glavnih komponenti DOM-a. Ugljikohidrati se dijele na monosaharide, disaharide, oligosaharide i polisaharide [54]. Monosaharidi su ugljikohidrati koji se sastoje od tri do devet ugljikovih atoma, a disaharidi od dva monosaharida. Oligosaharidi nastaju spajanjem tri ili više monosaharida, dok su polisaharidi ugljikohidrati složene strukture koji se sastoje od velikog broja monosaharidnih jedinica, zbog čega imaju veću molekulsku masu [54]. Oligosaharidi ili polisaharidi nastaju kombinacijom dva ili više monosaharida povezanih glikozidnim vezama (Slika 3) i kategorizirani su kao složeni ugljikohidrati [54]. Polisaharidi mogu biti sastavljeni od jednog tipa monosaharida ili od više različitih monosaharida.



Slika 3. Prikaz glikozidne veze, disaharid maltoze (preuzeto i prilagođeno iz [54]).

Glikozidna veza se naziva α -1,4-glikozidna veza ako nastane između C-1 ugljikova atoma jedne α -D-glukoze i kisikova atoma hidroksilne skupine vezane na C-4 ugljikov atom susjedne α -D-glukoze. Ovo je samo jedan od primjera nastanka veze između dvije glukoze. Naime, dvije heksoze iste vrste mogu se povezati s pomoću dvije konfiguracije veze (α ili β) preko šest mogućih ugljikovih atoma (1 $\rightarrow$ 1, 1 $\rightarrow$ 2, 1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4, 1 $\rightarrow$ 5, 1 $\rightarrow$ 6), što može rezultirati s 12 različitih disaharida (Slika 4). S različitim monosaharidima i povećanjem duljine polimera, raznolikost se eksponencijalno povećava [55]. Također je moguća razgranatost na bilo kojoj hidroksilnoj skupini što još više doprinosi raznolikosti polisaharida.



Slika 4. Strukturne kombinacije monosaharida. Dvije molekule glukoze mogu se povezati u 12 različitih disaharida. (preuzeto iz [56]).

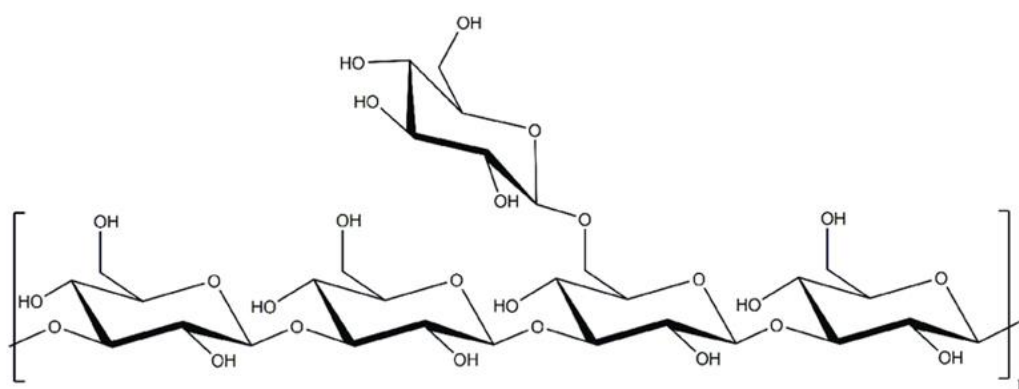
2.3.2. Polisaharidi u slatkovodnim ekosustavima

Ugljikohidrati čine većinu vodene, kao i kopnene biomase i značajan udio otopljenog organskog ugljika u jezerima [57]. Primarne komponente vodenog DOM-a su polisaharidi, odnosno ugljikohidrati, koji tradicionalno čine oko 5 do 20% ukupnog sastava vodenog DOM-a [58]. Međutim, nedavne studije sugeriraju da koncentracije ugljikohidrata mogu biti čak i veće u jezerskim ekosustavima. Na primjer, studija o sastavu DOM-a u jezerima otkrila je da ugljikohidrati čine 29–39% DOM-a u jezerima s različitim trofičkim stanjima [59]. Konkretno, u mezotrofnim jezerima ugljikohidrati čine približno 20% DOM-a [60], dok u eutrofnim jezerima taj postotak može porasti na 30% [61]. Najzastupljeniji monosaharidi su glukoza, galaktoza, fukoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza i manozna [62].

Izvori polisaharida u jezerima su raznoliki i promjenjivog podrijetla, kao što su lokalni autotrofni i heterotrofni procesi te alohtoni unosi iz kopnenih izvora [2]. Alohtoni ugljikohidrati u vodenom okolišu kopnenog su podrijetla i dospijevaju u vodene ekosustave ispiranjem tla i površinskim otjecanjem. Neki polisaharidi koji se obično nalaze u vodenom okolišu kopnenog su podrijetla jer su sastavni dijelovi biljnih stanica.

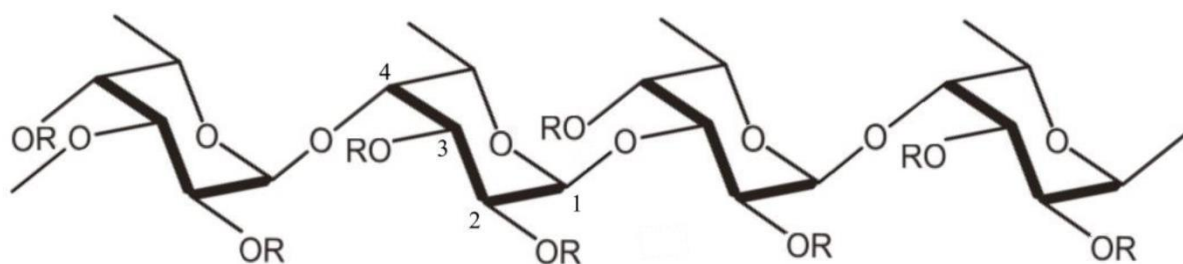
Većina ugljikohidrata u vodenom okolišu su alohtoni, koje obično proizvodi fitoplankton, ali mogu potjecati i od drugih organizama [14]. Fitoplankton u procesu fotosinteze koristi sunčevu energiju za pretvorbu ugljikova dioksida u ugljikohidrate, dok se kisik oslobađa kao nusprodukt razgradnje vode. Ugljikohidrati služe u dvije različite svrhe u mikroalgama, bilo kao strukturni spojevi u staničnoj stijenci ili kao skladišni spojevi unutar stanice gdje osiguravaju energiju za metabolizam [63,64]. Kao strukturni spojevi, ugljikohidrati, zajedno s proteinima i lipidima, omogućuju rast stanica u promjenjivom okruženju. Mikroalge i cijanobakterije sintetiziraju monosaharide različitim metaboličkim putovima, nakon čega slijedi sinteza složenih ugljikohidrata koji se mogu ugraditi u staničnu stijenu ili izlučiti kao izvanstanični polisaharidi (EPS).

Polisaharidi su složeni ugljikohidrati koji igraju ključnu ulogu u vodenim ekosustavima, kao strukturni elementi ili kao skladišna energija. Među najvažnijima je laminarin, linearni polisaharid sastavljen od približno 25 molekula glukoze povezanih β -(1 $\rightarrow$ 3) glikozidnim vezama, s bočnim lancima povezanim β -(1 $\rightarrow$ 6) vezama (Slika 5). Laminarin je glavni ugljikohidrat za skladištenje energije u algama, a procjenjuje se da njegova godišnja biosinteza doseže 6–18 gigatona ugljika, što predstavlja jednu osminu godišnje proizvodnje biomase na Zemlji [65].



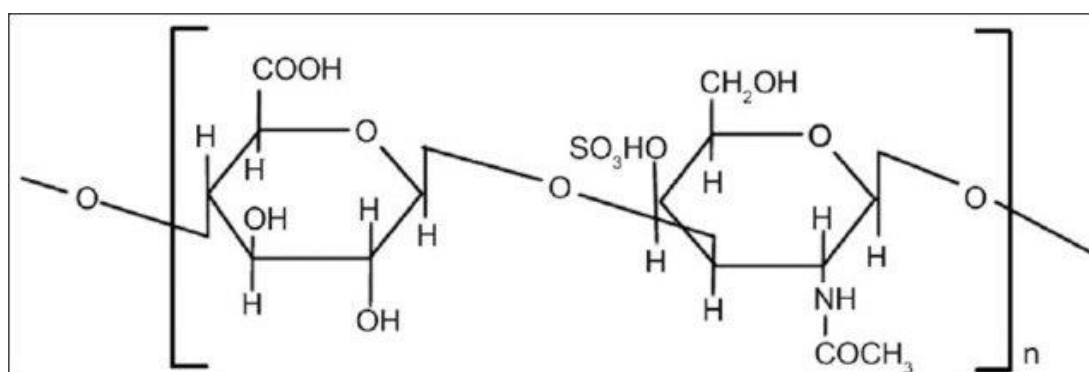
Slika 5. Struktura laminarina iz smeđe alge (preuzeto iz [66]).

Fukoidan je još jedan važan polisaharid u vodenim okolišima, a sastoji se od ostataka fukoze i sulfata, uz moguće prisustvo drugih monosaharida (Slika 6). Fukoidan dolazi u dva osnovna oblika, homofukan i heterofukan, koji se razlikuju u strukturi. Općenito se fukoidan nalazi u staničnim stijenkama smeđih algi, čineći čak 23% njihove suhe težine [67].



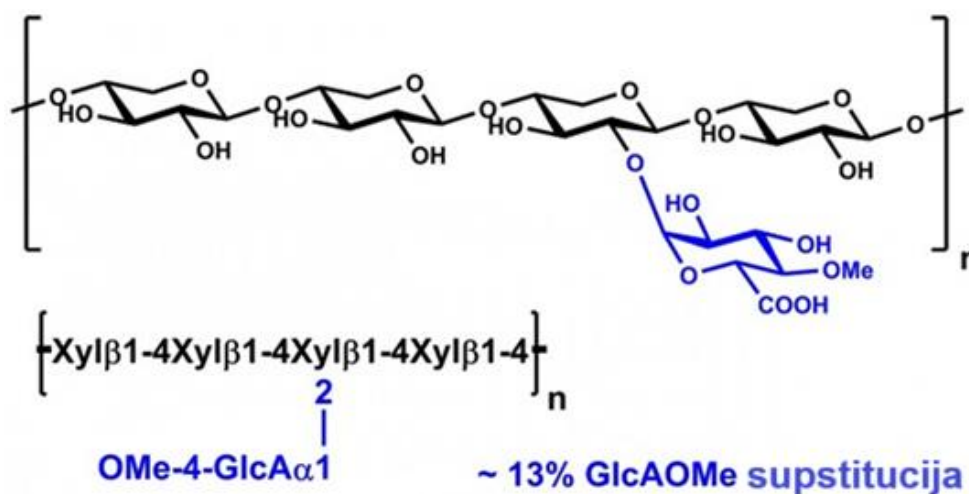
Slika 6. Struktura fukoidana tipa I u smeđoj morskoj algi. Ovo je prikaz uobičajenih lanaca okosnice fukoidana, a R može biti α -L-fukopiranoza, α -D-glukuronska kiselina i sulfatne skupine, dok mjesto galaktoza, manoz, ksiloza, ramnoza, arabinoza i glukoza u nekoliko vrsta morskih algi ostaju nepoznate (preuzeto iz [68]).

Hondroitin sulfat je sulfatirani glikozaminoglikan sastavljen od lanaca N-acetilgalaktozamina i glukuronske kiseline (Slika 7). Ovaj polisaharid može sadržavati više od 100 monosaharidnih jedinica, a stupanj sulfatacije varira. Prisutan je u staničnim stijenkama algi, gdje ima važnu ulogu u njihovoj strukturi i funkciji [69].



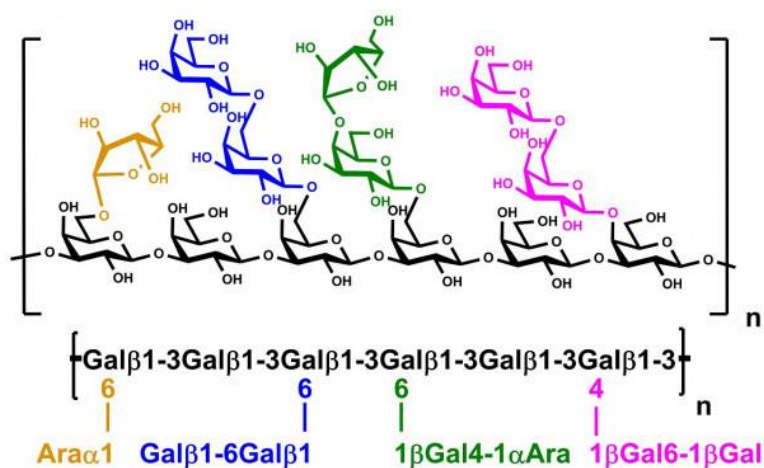
Slika 7. Struktura hondroitin sulfata (preuzeto iz [70]).

Ksilani su polisaharidi sastavljeni od β -1,4-povezanih ostataka ksiloze s bočnim ograncima arabinofuranoze i/ili glukuronske kiseline (Slika 8). Njihova struktura može varirati od jednostavnih, linearnih homoksilana do složenih heteroksilana, koji uključuju dodatne šećerne ogranke [71]. Ovi polisaharidi važni su u lignoceluloznoj biomasi, koja se sastoji od celuloze, hemiceluloze i lignina [72]. Hemiceluloza, koja čini 20–40% biomase, uključuje pentoze poput ksiloze i arabinoze, heksoze poput manoze i glukoze te šećerne kiseline poput metilglukuronske kiseline.



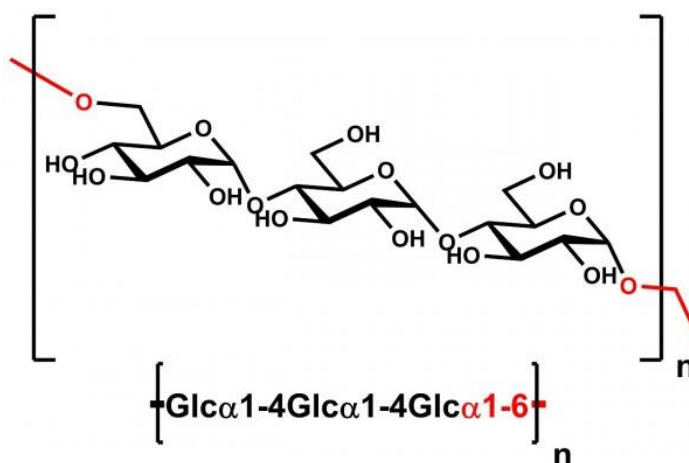
Slika 8. Struktura ksilana iz bukve. Omjer ksiloza:glukuronska kiselina:ostali šećeri = 84:10,3: 5,7 (preuzeto s [73]).

Arabinogalaktan je složen polisaharid koji se sastoji od lanaca arabinoze i galaktoze (Slika 9). Ovaj polisaharid čini važan dio staničnih stijena biljaka, gdje doprinosi njihovoj čvrstoći i funkciji [74].



Slika 9. Struktura arabinogalaktana iz drva ariša. Omjer galaktoze:arabinoze:drugih šećera = 81:14:5 (preuzeto s [73]).

Pululan je biopolimer sastavljen od trimera maltotrioze, povezanih α -(1→6) glikozidnim vezama (Slika 10). Ovaj polisaharid proizvode gljive, kvasci i lišajevi, a gljiva *Aureobasidium pullulans* najčešće se koristi za industrijsku proizvodnju zbog visokog prinosa i konzistentne kvalitete [75].



Slika 10. Struktura pululana izoliranog iz *Pullularia pullulans*. Glukoza = 95 (preuzeto s [73]).

2.4. Razgradnja polisaharida u vodenim ekosustavima

Heterotrofni mikroorganizmi, koje većinom čine bakterije, glavni su razlagači komponenti organske tvari u vodenim ekosustavima. Oni imaju ključnu ulogu kao konzumenti i remineralizatori DOM-a, pri čemu polisaharidi služe kao bitni supstrati za njihove metaboličke procese [3].

Polisaharidi su polimerne strukture zbog čega se teško razgrađuju, stoga heterotrofne bakterije izlučuju strukturno selektivne izvanstanične enzime sposobne za razgradnju složenih polisaharida u metabolički korisne monomerne jedinice [4]. Proizvodnja izvanstaničnih enzima ovisi o okolišu i njegovom sastavu, te se razlikuju dvije različite vrste, konstitutivni i inducibilni izvanstanični enzimi [76]. Konstitutivni enzimi se konstantno sintetiziraju neovisno o okolišu, dok se inducibilni enzimi sintetiziraju u velikim količinama kada supstrata ima u izobilju u okolišu. U nedostatku supstrata, inducibilni enzimi se i dalje sintetiziraju, ali u manjoj količini.

Općenito se obje vrste izvanstaničnih enzima za razgradnju polisaharida nazivaju enzimi koji aktivno djeluju na ugljikohidrate (engl. *carbohydrate-active enzymes*, CAZymes) [77]. Grupa CAZymes sastoji se od enzima uključenih u razgradnju, sintezu ili vezanje složenih ugljikohidrata koji su visoko specifični za glikozidne veze [78]. Svaka glikozidna veza u polisaharidima zahtijeva posebno prilagođen enzim za vezanje i hidrolizu. Složeni polisaharidi sadrže brojne različite glikozidne veze i za njihovu uspješnu razgradnju sve glikozidne veze moraju se cijepati određenim redoslijedom, što u većini slučajeva zahtijeva sinergiju različitih enzima [79]. Zbog toga glavne klase CAZymes skupine čine enzimi s različitim ulogama pri razgradnji polisaharida.

U ovu skupinu spadaju glikozidne hidrolaze (engl. *glycoside hydrolases*, GH), koje kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza [80], a geni koji ih kodiraju obilno su prisutni u većini bakterijskih genoma. Također, prisutne u gotovo svim organizmima su i glikoziltransferaze (engl. *glycosyltransferases*, GT), koje biosintetiziraju glikozidne veze iz fosfo-aktiviranih donora šećera [81]. Isto tako, polisaharidne liaze (engl. *polysaccharide lyases*, PL), odgovorne za cijepanje glikozidnih veza polisaharida koji sadrže urinsku kiselinu mehanizmom β -eliminacije [82]. Ugljikohidratne esteraze (engl. *carbohydrate esterases*, CE) uklanjaju modifikacije na bazi estera prisutne u mono-, oligo- i polisaharidima, čime olakšavaju djelovanje GH na složene polisaharide [83].

Osim toga, CAZymes uključuju i module vezanja ugljikohidrata (engl. *carbohydrate-binding modules*, CBM), fragmente proteina bez enzimatske aktivnosti, ali odgovorni za

potenciranje aktivnosti drugih enzima [84]. Proizvodnja svih nabrojenih enzima je energetski vrlo zahtjevna [7], osobito kada je za razgradnju jednog polisaharida potrebno više enzima. Potrošnja energije nadoknađuje se iskorištavanjem proizvedenih monosaharida [7].

Nedavna otkrića o članovima obitelji CBM33 i obitelji GH61, koji su litičke polisaharidne monooksigenaze (engl. *lytic polysaccharide monooxygenases*, LPMO), dovela su do stvaranja nove klase CAZyme enzima, poznate kao pomoćne aktivnosti (engl. *auxiliary activities*, AA) [85]. Ova klasa obuhvaća enzime za razgradnju lignina i LPMO, s obzirom na to da je lignin čvrsto i nepromjenjivo povezan s ugljikohidratima u staničnoj stijenci biljke. Lignolitički enzimi surađuju s klasičnim polisaharidnim depolimerazama kako bi omogućili učinkovitiju razgradnju. Trenutno, klasa AA grupira 9 obitelji ligninolitičkih enzima i 7 obitelji litičkih polisaharidnih monooksigenaza.

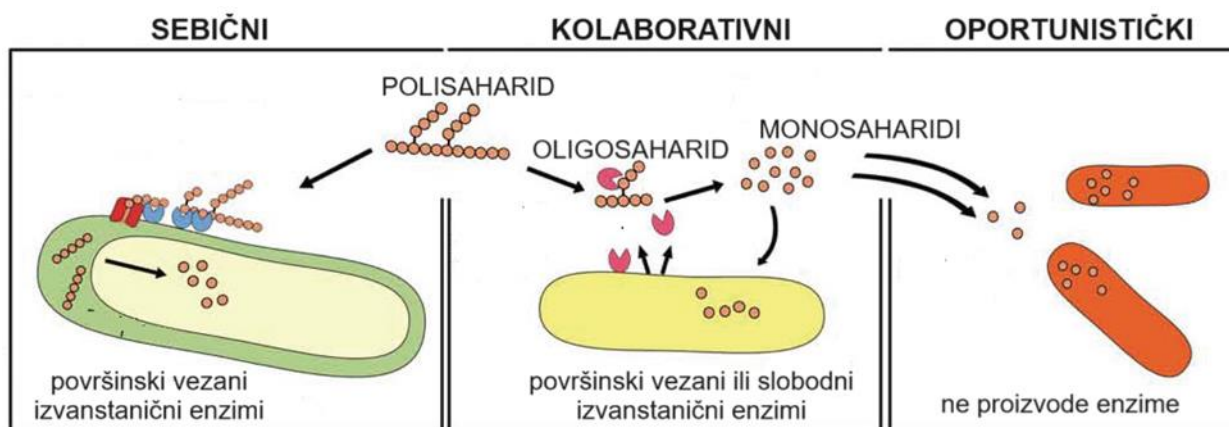
2.4.1. Mehanizmi razgradnje polisaharida

U vodenim ekosustavima bakterije razgrađuju polisaharide putem tri različita mehanizma [86]. U prvom mehanizmu bakterije proizvode i otpuštaju površinski vezane ili slobodne izvanstanične enzime. Proizvedeni enzimi hidroliziraju polisaharide u monosaharide ili oligosaharide izvan bakterijske stanice, te su oni slobodno dostupni u vodenom okolišu. Produkti hidrolize polisaharida su stoga slobodno dostupni za remineralizaciju od strane istih bakterija koje su ih proizvele, čime bakterije nadoknađuju potrošene resurse. Bakterije uključene u prvi mehanizam nazivaju se kolaborativne bakterije (engl. *sharing bacteria*) [8].

Produkti hidrolize polisaharida osim što su dostupni kolaborativnim bakterijama za remineralizaciju, dostupni su i bakterijama uključenim u drugi mehanizam. Te bakterije nazivaju se oportunističke bakterije (engl. *scavenging bacteria*) [8]. Ove bakterije ne proizvode izvanstanične enzime za hidrolizu polisaharida već profitiraju od aktivnosti drugih bakterija. Odnosno koriste dostupne oligosaharide ili monosaharide proizvedene od kolaborativnih bakterija za remineralizaciju. Oportunističke bakterije stoga su u energetskom profitu, dok kolaborativne bakterije imaju samo djelomičnu korist od svojih enzimskih aktivnosti [6].

U treći mehanizam razgradnje polisaharida uključene su sebične bakterije (engl. *selfish bacteria*) [8,86]. Sebične bakterije također proizvode izvanstanične enzime koji su uvijek vezani za površinu bakterijske stanice. Površinski enzimi na sebe vežu polisaharide i djelomično ih hidroliziraju u oligosaharide. Proizvedene oligosaharide odmah prenose u periplazmu bakterijske stanice za daljnju hidrolizu [9]. Unutar bakterijske stanice oligosaharidi

se razgrade do monosaharida koji se koriste za remineralizaciju. U sebičnom mehanizmu, bakterije imaju malo ili nimalo gubitka proizvoda hidrolize [9] i nadoknađuju resurse koji su koristile za proizvodnju izvanstaničnih enzima. Sebični mehanizam razgradnje polisaharida izvorno je otkriven u crijevnom mikrobiomu [9], a njegova značajna uloga istražena je i dokazana u morskom ekosustavu [11,86–88].



Slika 11. Shematski prikaz tri glavna mehanizma iskorištavanja polisaharida. Sebični mehanizam u kojem sudjeluju sebične bakterije; kolaborativni mehanizam u kojem sudjeluju kolaborativne bakterije i oportunistički mehanizam u kojem sudjeluju oportunističke bakterije. (preuzeto i prilagođeno iz [8]).

2.4.2. Dosadašnja istraživanja mehanizama razgradnje polisaharida u vodenim ekosustavima

Relativan odnos mehanizama razgradnje polisaharida detaljno je istražen u morskom ekosustavu, a razgradnja različitim mehanizmima varira ovisno o lokaciji, sezoni i vrsti uključenih polisaharida [11,87,88].

Tijekom sezonskog istraživanja u Sjevernom moru otkriven je značajan doprinos sebičnog mehanizma pri razgradnji polisaharida tijekom ljetnih mjeseca [11]. U lipnju je zabilježena visoka razina sebične aktivnosti, na početku inkubacija bila je prisutna kod 30%, a kasnije i do 60% bakterija. U istom razdoblju, stopa vanjske hidrolize zabilježena je tek nakon 24 sata inkubacija i to kod 20% bakterija. Tijekom travnja i svibnja, sebična aktivnost bila je konstantno prisutna kod 20% bakterija, dok je stopa vanjske hidrolize zabilježena tek na kraju inkubacija, kod 10-30% bakterija. Krajem ljeta, u ranoj jeseni, sebična aktivnost ostala je visoka

(do 50%), a tada su zabilježne i najviše stope vanjske hidrolize (preko 40%). U zimskom periodu, i sebična aktivnosti i stopa vanjska hidroliza bile su niske, i pojavile su se tek na kraju inkubacija i u manje od 20% bakterija.

Slični rezultati su dobiveni tijekom istraživanja odnosa različitih mehanizama tijekom proljetnog cvjetanja fitoplanktona u Sjevernom moru [12]. U ranom periodu cvjetanja zabilježena je niska sebična aktivnost (kod manje od 5% bakterija) i niske stope vanjske hidrolize (oko 4 nmol monomer L⁻¹ h⁻¹). Usred cvjetanja fitoplanktona došlo je do povećanja sebične aktivnosti (kod 25% bakterija) i stope vanjske hidrolize (oko 8 nmol monomer L⁻¹ h⁻¹). U kasnom periodu cvjetanja fitoplanktona zabilježena je niska sebična aktivnost (ispod 10% bakterija), a visoke stope vanjske hidrolize (do 10 nmol monomer L⁻¹ h⁻¹) [12].

Istraživanja na različitim lokacijama u oceanima, otkrila su veće postotke sebične aktivnosti na većim dubinama [10]. Tako su na dubinama od 4000 do 5000 m, okarakteriziranim kao vode na dnu, zabilježene veće sebične aktivnosti (do 70% bakterija) u usporedbi s površinskim vodama (do 20% bakterija) Atlanskog oceana. Stope vanjske hidrolize su suprotno tome bile veće u površinskim vodama (do 20 nmol monomer L⁻¹ h⁻¹), a niže u vodama na dnu (oko 3 nmol monomer L⁻¹ h⁻¹). Također su visoki postoci sebične aktivnosti (do 60% bakterija) zabilježeni prilikom istraživanja Južnopacifičkog vrtloga (engl. *South Pacific Gyre*), oligotrofni vrtlog okarakteriziran vrlo niskom koncentracijom klorofila A i anorganskog dušika [13]. Osim na otvorenom oceanu, istraživanja o razgradnji polisaharida različitim mehanizmima provedena su i u umjerenim obalnim vodama. Tako je i u sjevernom Jadranskom moru dokazana prisutnost sebičnih bakterija [89].

Istraživanja o razgradnji polisaharida u jezerima pokazala su razlike ovisno o trofičkom stanju jezera. Oligotrofna i mezotrofna jezera s nižim koncentracijama DOM-a oslanjaju se na izvanstanične enzime koje proizvode mikrobi za kruženje hranjivih tvari [90,91], dok eutrofna jezera ovise o unutarnjoj regeneraciji putem mikrobne razgradnje i kemijske desorpcije [92]. U slatkovodnim ekosustavima istraživanja o razgradnji polisaharida su se bazirala isključivo na vanjskoj hidrolizi, dok aktivnost sebičnih bakterija nije istraživana ni dokazana. Studija o vanjskoj hidrolizi polisaharida između jezera s različitim trofičkim stanjem tijekom nekoliko sezona [14] otkrila je ovisnost aktivnosti enzima o sezoni, ali i o tipu jezera. Općenito, zabilježena je veća izvanstanična enzimsko aktivnost u jezerima s višim trofičkim stanjem (iznad 15 nmol monomer L⁻¹ h⁻¹), te tijekom proljeća (do 46 nmol monomer L⁻¹ h⁻¹). Također

su u jezerima s višim trofičkim stanjem izvanstanično razgrađeni različiti polisaharidi, dok su se u jezerima nižeg trofičkog stanja razgradili samo neki polisaharidi.

Ipak, detaljno razumijevanje uloge sebičnog mehanizma u razgradnji i unosu polisaharida iz alohtonih naspram autohtonih izvora u slatkovodnim jezerima ostaje nepotpuno. Konkretno, razumijevanje doprinosa različitih mehanizama razgradnje polisaharida tijekom vremena (rani u odnosu na kasne faze cvjetanja) i kroz različite tipove jezera (oligotrofni u odnosu na mezotrofni). To uključuje ispitivanje sezonskih varijacija i prostornih razlika kako bi se u potpunosti razumjelo korištenje polisaharida u jezerima.

2.5. Metode neovisne o kultivaciji

Istraživanja u mikrobnoj ekologiji podrazumijevaju korištenje molekularnih metoda. Razvoj molekularnih metoda neovisnih o kultivaciji doprinio je boljem razumijevanju raznolikosti i formiranju mikrobnih zajednica u vodenim okolišima. Osim toga razvojem metode sekvenciranja omogućeno je proučavanje ekspresije gena te njihove regulacije.

2.5.1. Sekvenciranje nove generacije

Svaka analiza o mikrobnim zajednicama određenog okoliša započinje kvalitetnom izolacijom ukupne DNA. Iako se protokoli izolacije razlikuju, svaki je koncipiran od nekoliko ključnih koraka, liza stanice, uklanjanje proteina, kemijsko uklanjanje te pročišćavanje DNA. Dobivena genomska DNA iz svih mikroba u uzorku amplificira se i pripremi za sekvenciranje lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). PCR se koristi kako bi se ciljano umnožio gen iz ukupne genomske DNA, čime se dobiva dovoljna količina specifičnog fragmenta za daljnju analizu na sekvencatoru [93]. Za PCR reakciju potrebni su termostabilni enzim polimeraza, par početnica, nukleotidi koji se ugrađuju u novu DNA, puferi, te ostali dodatci kao što su soli Mg^{2+} [93]. Prilikom amplifikacije izmjenjuju se ciklusi grijanja i hlađenja. Enzim polimeraza kopira izoliranu DNA pomoću odabranih parova početnica [93], koje su početne točke amplifikacije. Puferi i dodaci osiguravaju optimalne uvjete za vezanje početnica i aktivnost polimeraze [93]. PCR se provodi u tri glavna koraka, a započinje prvobitnim grijanjem do 95 °C kada se dvolančana DNA denaturira [94]. Idući korak uključuje hlađenje na temperature između 37 do 72 °C, ovisno o korištenim početnicama. Tijekom

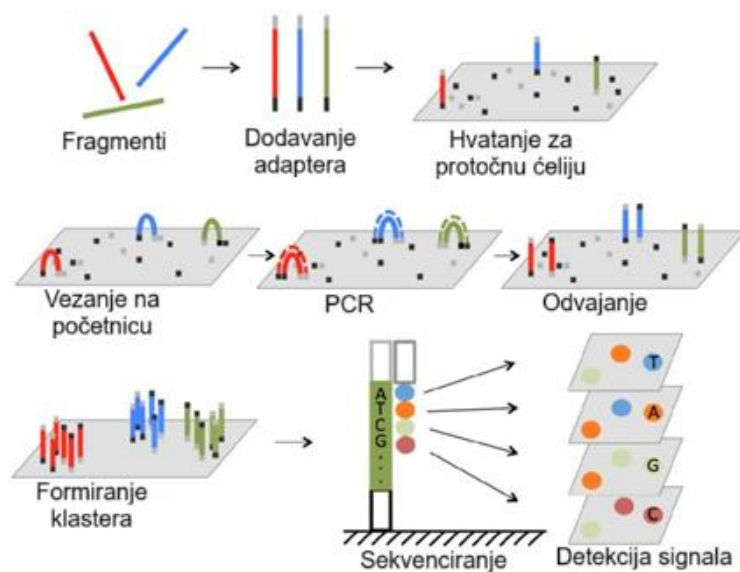
hlađenja početnice se vežu na ciljna mjesta DNA, počevši od 3' kraja jednolančane DNA, jer je hlađenjem omogućeno ponovno stvaranje vodikovih veza [94]. Zadnji korak uključuje ponovno grijanje do temperature 75 – 80 °C, čime se aktivira enzim polimeraza koja produžavanjem početnice kopira ciljani gen [93]. Početnice su specifično dizajnirane prema dijelovima gena koji se kopira, što omogućuje selektivnu amplifikaciju [93]. U jednom ciklusu se stvore dvije kopije ciljanog gena, a sveukupno se ciklus ponavlja 25-30 puta, čime je omogućena eksponencijalna amplifikacija ciljanog gena. Obavezno se provode negativne kontrole u kojima nije dodana DNA kako bi se detektirala kontaminacija. Kopirani genski produkt iz amplifikacije PCR-om se zove amplikon. Dodatno se PCR-om dodaju adapteri na dobivene amplikone [95]. Adapteri su pričvršćeni na kraj korištenih početnica, a različiti sastav im omogućuje hvatanje amplikona, čitanje i prepoznavanje prema porijeklu iz uzorka, odnosno indeksiranje. Na taj se način više različitih uzoraka može istovremeno analizirati (multipleksiranje), a podaci se kasnije razdvajaju po uzorcima (demultipleksiranje) [95].

Molekularna identifikacija prokariota se najčešće obavlja na genu 16S rRNA. Gen 16S rRNA kodira za RNA komponentu u prokariotskom ribosomu. Gen 16S rRNA ima visoko očuvane regije između različitih vrsta prokariota, a među njima se nalaze hipervarijabilne regije nazvane od V1 do V9 [96]. Iako se hipervarijabilne regije razlikuju među vrstama i omogućuju razlikovanje organizama unutar viših taksonomskih razina, kao što su domena ili rod, njihova razlučivost često nije dovoljna za pouzdanu klasifikaciju na razini vrste. Stoga se često koristi polukonzervirana hipervarijabilna regija V4 jer može dati rezoluciju od domene do vrste [96]. 16S rRNA gen se zbog navedenih karakteristika dugi niz godina koristi za filogenetsku klasifikaciju i identifikaciju prokariota te su sva saznanja obuhvaćena u opširne baze podataka od kojih se ističu SILVA ili RDP (engl. *Ribosomal Database Project*).

Za taksonomsku identifikaciju gljiva najčešće se koristi ITS (engl. *Internal Transcribed Spacer*) regija. ITS regija relativno je kratka (600-800 parova baza) i dvije se nalaze u svim eukariotima. ITS1 se nalazi između 18S i 5.8S rRNA gena, dok se ITS2 nalazi između 5.8S i 28S rRNA gena [97]. ITS2 regija bolje je očuvana od ITS1 regije zbog čega zajedno omogućuju filogenetsku identifikaciju do taksonomske klasifikacije roda, a u nekim slučajevima i do vrste [97]. Baza podataka sekvence ITS regije postaju opsežnije povećanjem broja istraživanja, a najpotpunije su UNITE i GenBank.

Amplikon produkti nakon PCR-a pripremljeni su za sekvenciranje. Sekvenciranje DNA u posljednjim desetljećima doživljava veliki napredak. Tako su se od početne prve generacije

sekvenciranja, odnosno Sangerova sekvenciranja [98], razvile i druga, treća i četvrta generacija, koje se zajednički nazivaju sekvenciranje nove generacije [99]. Prilikom sekvenciranja novim generacijama milijarde fragmenata nukleinskih kiselina mogu se simultano sekvencirati [99], dok se u Sangerovoj metodi jedna nukleotidna sekvenca obrađuje po reakciji. Illumina platforma najčešće je korištena metoda sekvenciranja nove generacije, a koristi tehnologiju sekvenciranja na temelju sinteze [100]. Priprema uzorka za sekvenciranje započinje fragmentiranjem genomske DNA na kraće sekvence optimalne duljine od 200 do 600 parova baza, nakon čega se na krajeve fragmenata ligiraju adapteri [101]. Adapteri su kratke sintetske oligonukleotidne sekvence, koji omogućuju vezanje fragmenta na površinu Illumina sekvencijskog čipa. Površina čipa (engl. *flow cell*) prekrivena je oligonukleotidima komplementarnima adapterima, koji omogućuje imobilizaciju DNA fragmenata nakon njihovog vezanja [101]. Drugi slobodni kraj fragmenta DNA se savije i veže na drugi obližnji oligonukleotid [101]. Premošćavajućim PCR-om se fragment DNA se višestruko amplificira, stvarajući guste nakupine identičnih sekvenci (tzv. klastere). Sekvenciranje se provodi pomoću reverzibilno terminiranih fluorescentno označeni dideoksinukleotidi (A, T, G, C). Fluorescentno označeni nukleotidi imaju blokirajuće skupine na 3' hidroksilnoj skupini zbog čega se može ugraditi samo po jedan nukleotid u polinukleotidni lanac u jednom ciklusu sekvenciranja. Nakon svakog ciklusa, ugrađeni nukleotid emitira karakteristični fluorescentni signal, koji se detektira kamerom visoke osjetljivosti [101]. Nakon određivanja ugrađenog nukleotida, fluorescentna oznaka se cijepa u blokirajuću skupinu, čime se omogućuje nastavak sinteze u sljedećem ciklusu [101]. Ovaj proces omogućuje precizno očitavanje sekvence nukleotid po nukleotid, s visokom točnošću i propusnošću [100].



Slika 12. Princip sekvenciranja na Illumina platformi. Illumina tehnologija sekvenciranja, temelji se na Sekvenciranju putem sinteze (SBS). Načelo SBS-a uključuje snimanje fluorescentno obilježenih dNTP-a, a potom cijepa kako bi se omogućila ugradnja sljedeće baze. (preuzeto i prilagođeno iz [101]).

Amplikoni se sekvenciraju sa svakog kraja u dužini od 300 parova baza koji se u obradi podataka spajaju do dužine 550 parova baza zbog čega se ovaj tip sekvenciranja dodatno naziva i sekvenciranje uparenih krajeva (engl. *paired-end sequencing*) [102].

Uz opisano amplicon sekvenciranje, moguće je neciljano sekvenciranje svih mikrobnih genoma u uzorku (engl. *Shotgun metagenomic sequencing*) [103] čime je omogućena analiza cjelokupnog genomskog materijala prisutnog u kompleksnom uzorku. Osim analize bioraznolikosti mikrobnih zajednica, sekvenciranje metagenoma omogućilo je karakterizaciju genetske i genomске raznolikosti uz mogućnost definiranja funkcionalnog potencijala istih u proučavanim zajednicama.

Illumina platforma ima visoku propusnost, odnosno može sekvencirati veliki broj malih fragmenata DNA, a u isto vrijeme ima malu stopu pogrešaka [100]. Manji nedostatak ove platforme je mogućnost sekvenciranja samo kraćih fragmenata (50 – 300 parova baza) zbog čega postoji mogućnost ograničenja u *de novo* sastavljanju genoma i analiziranju kompleksnih regija. Ipak, ovaj problem se rješava spajanjem kratkih sekvenci u veće sklopove uz pomoć bioinformatičkih alata [104].

U trećoj i četvrtoj generaciji razvijene su platforme poput PacBio i Nanopore, koje omogućuju sekvenciranje dugih očitavanja [105]. Iako ove tehnologije imaju značajnu prednost dugih očitavanja, koja su ključna za de novo sekvenciranje genoma i analizu kompleksnih regija, njihova se primjena još uvijek znatno rjeđe bilježi u odnosu na dominantnu Illumina platformu. Razlog su veća stopa pogrešaka, niža propusnost te više cijene sekvenciranja u usporedbi s Illuminom [106]. Nakon sekvenciranja, prvi korak obrade dobivenih sekvenci je analiza kvalitete i filtriranje podataka. Filtriranje uključuje uklanjanje adaptera za sekvenciranje, odbacivanje očitavanja niske kvalitete te eliminaciju kontaminanata. Kvalitetno filtriranje nužan je korak za metagenomsku analizu kako bi se dobile točne i smislene procjene mikrobne zajednice. Nakon filtriranja, kvalitetne sekvence se sastavljaju u duže nizove nukleotida zvane kontigi (engl. *contigs*) [107], koji se zatim grupiraju prema pripadanju istom biološkom taksonu (vrsta ili rod). Dobivene grupirane sekvence nazivaju se bin-ovi (engl. *bins*). Nakon dodatne kvalitativne provjere dobivenih bin-ova, izdvajaju se oni koji su visoke kvalitete i podvrgavaju se taksonomskoj klasifikaciji. Rezultat ovog procesa su visoko-kvalitetno generirani bin-ovi, poznati kao MAG-ovi (engl. *Metagenome Assembled Genomes*, MAG) [108]. Nakon taksonomske klasifikacije sekvenci slijedi identifikacija gena i regulatornih elemenata unutar genoma, kao i funkcionalna anotacija tih gena kojima se određuje funkcionalni kapacitet mikrobne zajednice.

2.5.2. Fluorescentna *in situ* hibridizacija

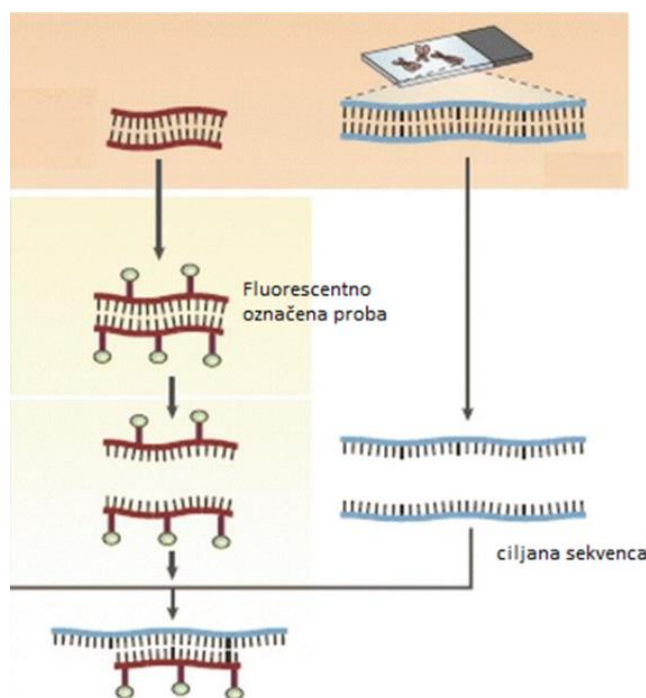
Određivanje strukture mikrobnih zajednica može se provesti i fluorescencijskom *in situ* hibridizacijom (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) [109]. To je molekularna tehnika koja omogućuje lokalizaciju specifičnih sekvenci nukleinskih kiselina u stanici, čime se identificiraju određeni mikroorganizmi u kompleksnim uzorcima, bez potrebe za kultivacijom.

Postupak pripreme uzorka počinje fiksiranjem i filtracijom uzorka koji sadrže mikrobne stanice. Fiksacija uzorka je neophodna za očuvanje morfologije stanica, a kao fiksativ najčešće se koristi formaldehid jer osigurava očuvanje i nukleinskih kiselina i proteinskih struktura. Filtracija se provodi u slučaju tekućeg uzorka prilikom čega ciljane zajednice zaostaju na filteru određene veličine pora [110]. Ključan korak u FISH protokolu je dodatak hibridizacijskog pufera, koji sadrži različite komponente, uključujući formamid i fluorescentno obilježene probe [109]. Formamid smanjuje temperaturu potrebnu za denaturaciju DNA molekule, dok

fluorescentno obilježene probe predstavljaju sintetizirane jednolančane sekvence komplementarne ciljanom području DNA ili RNA [110]. Tijekom hibridizacije, fluorescentno obilježene probe vežu se za specifične ciljane sekvence u uzorku, pri čemu emitiraju fluorescentni signal (Slika 13) [111]. Hibridizacijski korak provodi se na povišenim temperaturama kako bi se osiguralo specifično vezanje, jer se pri povišenim temperaturama destabiliziraju nespecifične interakcije.

Nakon hibridizacije, uzorci se ispiru u puferu kako bi se uklonile nevezane probe. Koncentracije formamida koje se dodaju u hibridizacijski pufer, a naknadno i koncentracije natrijeva klorida koji se dodaje u pufer za ispiranje ovise o korištenoj probi [110].

Rezultati FISH metode vidljivi su fluorescentnim mikroskopom, gdje se ciljane sekvence vizualiziraju kao fluorescentni signali u stanicama.



Slika 13. Principi fluorescentne in situ hibridizacije (FISH). (a) Osnovni elementi FISH-a su fluorescentno obilježena proba i ciljna sekvenca. Nakon denaturacije obje, u procesu hibridizacije, fluorescentno obilježena proba veže se za specifičnu ciljanu sekvencu u uzorku i emitira fluorescentni signal (preuzeto i prilagođeno iz [111]).

2.6. Vizualizacija unosa ugljikohidrata pomoću fluorescentnih polisaharida

Fluorescentnim označavanjem polisaharida moguće je vizualizirati interakcije između ugljikohidrata i mikroorganizama, isto kao i odrediti kvantifikaciju stope hidrolize ugljikohidrata u kulturama i kompleksnim uzorcima iz različitih okoliša [112].

Eksperimenti inkubacije s fluorescentno obilježenim polisaharidima (engl. *Fluorescently-labeled polysaccharides*, FLAPS) trenutačno su jedna od rijetkih metoda za uvid u mehanizme razgradnje polisaharida s mogućnošću povezivanja funkcije s identitetom specifičnih bakterija [112]. U početku su FLAPS korišteni za mjerenje stope hidrolize enzima *in situ*, ali je tehnika proširena na proučavanje unosa ugljikohidrata od strane bakterija u čistim i složenim zajednicama, te za različite mehanizme razgradnje polisaharida [56].

Metoda proizvodnje FLAPS rezultira polisaharidnim derivatima u kojima su molekule fluoresceinamina (FLA) stohastički konjugirane na hidroksilne skupine duž polisaharida [113]. Polazna točka je aktivacija polisaharida s CNBr-om. Aktivacija rezultira stvaranjem cijanatnog estera na slobodnim hidroksilnim skupinama polisaharida, a dodavanje fluorofora fluoresceinamina dovodi do reakcije između polisaharidnih cijanatnih estera i primarnih amina fluorofora [113]. Između fluorofora fluoresceinamina i polisaharida se stvori stabilna kovalentna veza, nakon čega slijedi pročišćavanje otopine od nespojenih fluorofora [113]. Uspješnost označavanja derivatiziranog polisaharida (molarni omjer fluorofora i polisaharida) dijelom ovisi o pH reakcijske smjese i broju potencijalno reaktivnih hidroksilnih skupina [112]. Jednom aktivirani, derivatizirani i pročišćeni, FLA-polisaharidi su izuzetno stabilni na ponovljene cikluse smrzavanja i odmrzavanja, kao i na značajan raspon temperature.

Pripremljeni FLAPS dodaje se tekućem uzorku ili mediju kulture i inkubira (Slika 14) [112]. Poduzorci inkubacija se povremeno prikupljaju i filtriraju, te analiziraju. Sebično nakupljanje FLAPS-a u periplazmi bakterijske stanice može se vizualizirati standardnim epifluorescentnim mikroskopom nakon bojenja DNA [86]. Preklapanje signala FLAPS i DNA obojenja na istoj lokaciji dokaz je postojanja FLAPS-a u periplazmi bakterijske stanice i sebičnog mehanizma razgradnje polisaharida [86]. Uz dokaz sebičnog mehanizma, moguće je i mjeriti stopu vanjske hidrolize razgradnje polisaharida izvanstaničnim enzimima bakterija korištenjem gel permeacijske kromatografije i detekcije fluorescencije [8,13]. Nadalje, u kombinaciji sa sekvenciranjem, pomoću FLAPS inkubacija mogu se identificirati metabolički aktivne zajednice i novi funkcionalni metabolički putovi ili CAZymes.

Nakon dokaza o prisutnosti sebičnih bakterija u ispitanom uzorku, moguće je taksonomski identificirati bakterije koje sebično razgrađuju dodane polisaharide [8,86,112]. Sekvenciranje amplikona 16S rRNA gena koristi se za analizu sastava bakterijske zajednice. Uz ispitane poduzorke s dodanim FLAPS-om potrebno je sekvencirati i neizmijenjene kontrolne tretmana (inkubacije kojima nisu dodani FLAPS) kako bi se razlikovali učinci inkubacije boce od odgovora zajednice koji ovise o dodanom FLAPS-u [112].

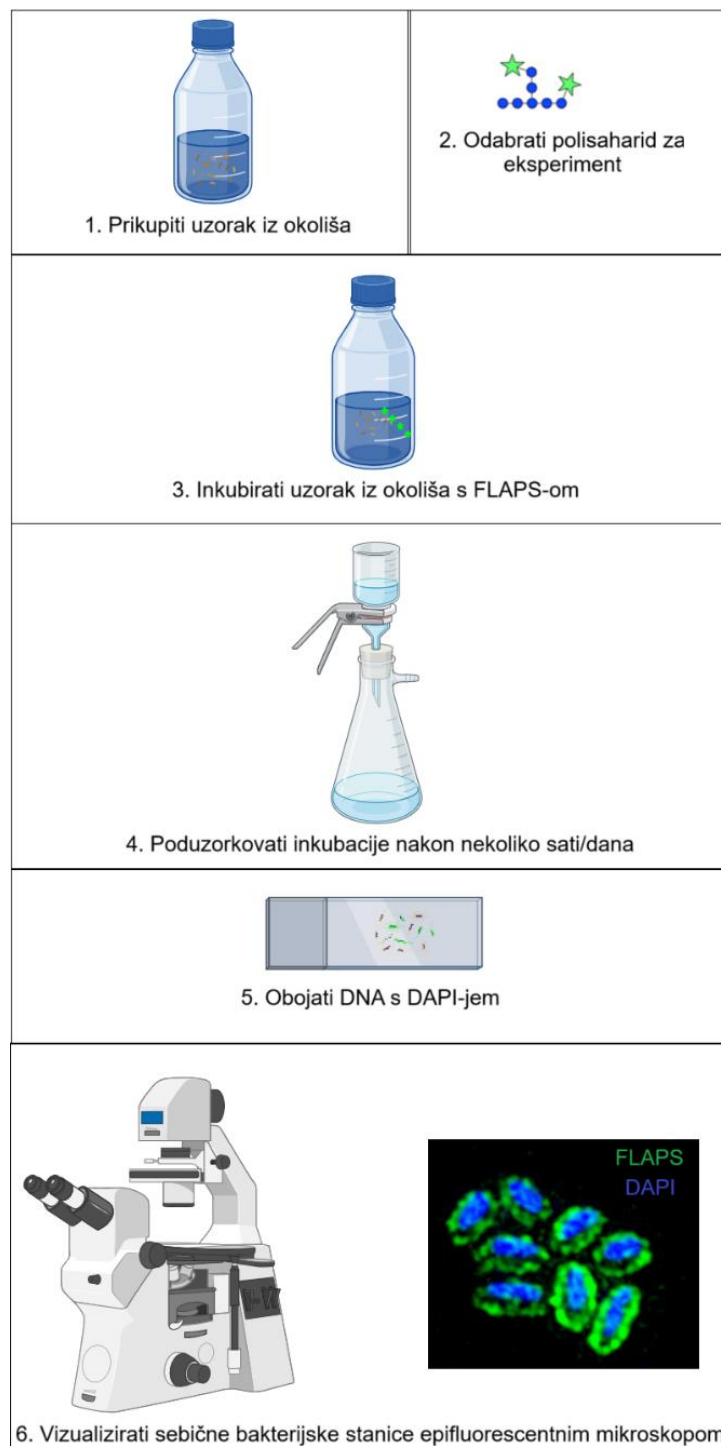
Nadalje, sebične bakterije mogu se filogenetski obojiti i mikroskopski prebrojati pomoću fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Taksonomski specifične FISH probe odabiru se nakon taksonomske identifikacije prisutnih bakterija sekvenciranjem amplikona kako bi se odredila njihova apsolutna zastupljenost [112]. Također se kombinacijom FLAPS i FISH metode vizualno povezuje specifična bakterija sa sebičnim nakupljanjem polisaharida [8,12,13]. Za vizualizaciju bakterijskih skupina mogu se koristiti različite FISH metode koje ciljaju rRNA. Ispitivanja su pokazala da je modificirani protokol Manza i sur. [114] s četverostruko obilježenim oligonukleotidnim probama najprikladniji za identifikaciju sebičnih bakterija obojenih FLAPS-om. Ovaj protokol je kompatibilan s FLAPS inkubacijom jer je protokol manje grub u usporedbi s drugima (na primjer CARD-FISH), ima manje koraka i omogućuje jasnu detekciju FISH signala.

Vanjskom hidrolizom polisaharida bakterije u okolišu proizvode monomere niske manje molekulske mase, a stopa hidrolize može se mjeriti gel permeacijskom kromatografskom analizom filtrata prikupljenog u svakoj vremenskoj točki, odnosno iz poduzoraka [113]. Stope hidrolize izračunaju se na temelju promjena u klasama molekulske mase, naime polisaharid se postupno razgrađuje u hidrolizne produkte manje molekulske mase tijekom vremena [113].

U slučajevima teške identifikacije specifičnih bakterijskih stanica koristi se protočna citometrija (engl. *Flow cytometry*) za identifikaciju bakterija na temelju njihovih fizičkih i fluorescentnih svojstava i sortiranje na temelju fluorescencije FLAPS [11]. Protočna citometrija može se koristiti u okolišnim uzorcima za identifikaciju subpopulacija stanica obojenih FLAPS-om. Potrebne su različite kontrole, uključujući slijepu kontrolu zajednice s kontrastnom bojom nukleinske kiseline za kalibraciju pozadinske buke.

Nadalje, za procjenu taksonomskog sastava i funkcionalnog potencijala aktivnih sebičnih bakterija u složenoj zajednici može se koristiti razvrstavanje stanica aktivirano fluorescencijom (engl. *Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) [11]. Ovdje se odabrane bakterijske

populacije odvajaju od uzorka i obogaćuju, nakon čega je moguće primijeniti FISH metodu za kvantificiranje specifičnih bakterija.



Slika 14. Jednostavan protokol rada za identifikaciju sebičnih bakterija u složenim uzorcima kroz eksperiment inkubacije s fluorescentno obilježenim polisaharidima (FLAPS; Izvor: vlastita izrada u Biorender.com).

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Prva faza istraživanja

3.1.1. Područje istraživanja i uzorkovanje

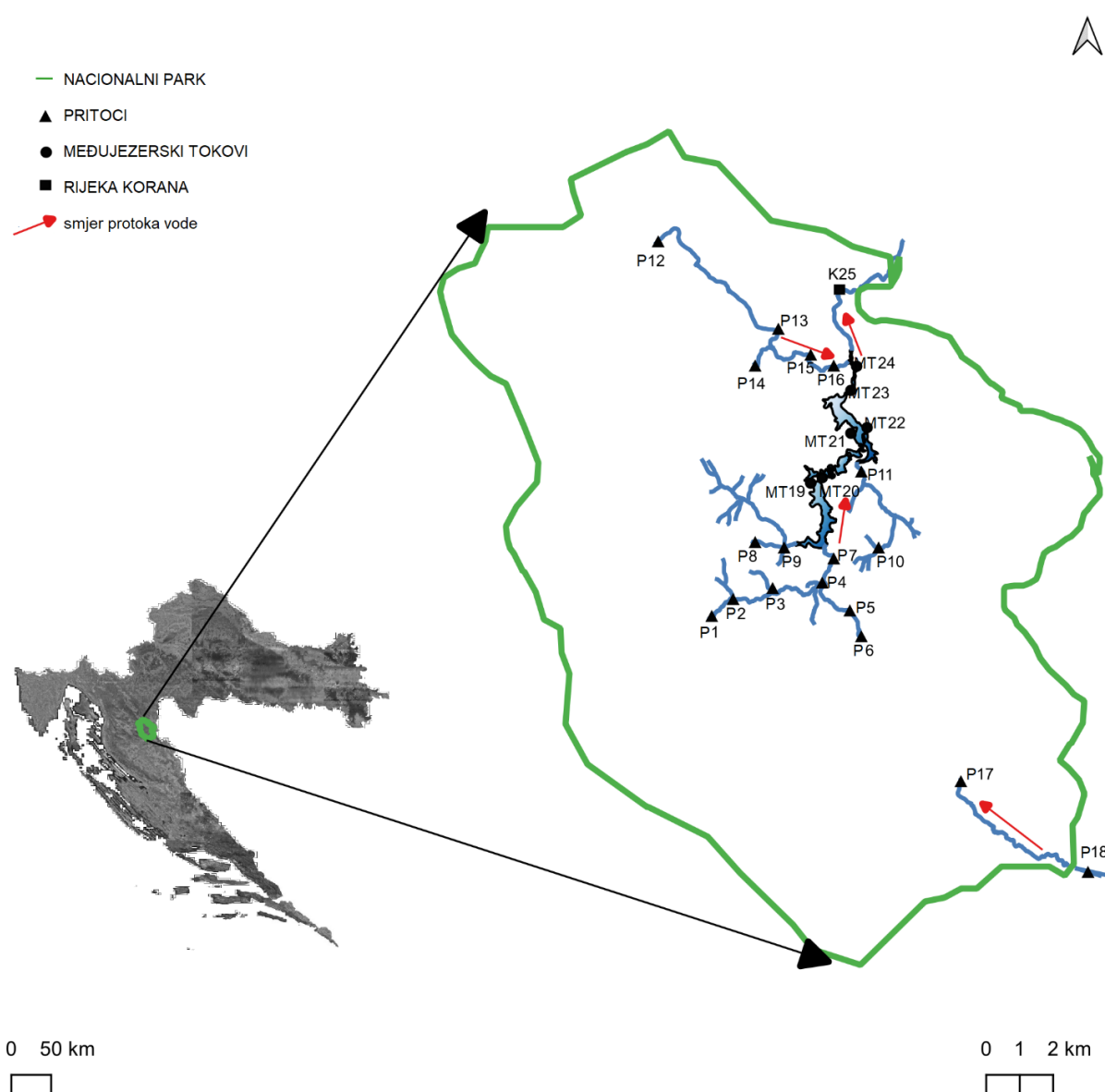
U prvoj fazi istraživanja uzorci vode prikupljeni su iz svih vodotokova u površinskom slivu Plitvičkih jezera na 25 različitih lokacija (Slika 15). Područje interesa uključivalo je tri različita tipa vodotoka: pritoke (uzorci P1 do P18), međujezerske tokove (uzorci MT19 do MT24) i rijeku Koranu (uzorak K25).

Pritoci su uzorkovani na ukupno 18 lokacija (Dodatna Tablica 1), uključujući točke niz dva najvažnija opskrbljivača vodom, Bijelu rijeku i Crnu rijeku. Uzorkovani su također i pritoci Bijele rijeke, potoci Vukmirović i Ljeskovac. Pritoci su također uključivali lokacije uz potoke Sušanj i Rječicu, koji se ulijevaju u dva najveća jezera u sustavu, Prošćansko i Kozjak. Uzorkovani su i udaljeniji Korenički potok u Drakulić Rijeci, te Rijeka Korenička. Na kraju su uzorkovani potok Plitvice na tri lokacije, te potok Sartuk, koji se zajedno ulijevaju u rijeku Koranu niz slap visok 76 m.

Međujezerski tokovi su potoci koji povezuju 16 jezera u jedinstveni sustav. Međujezerski tokovi uzorkovani su na šest lokacija: Labudovačke barijere, izlazne barijere Gradinskog jezera, kanal na Kozjačkim mostovima i ulazna barijera u jezero Novakovića Brod (Dodatna Tablica 1).

Kao posljednja lokacija sliva Plitvičkih jezera uzrokovana je rijeka Korana kao središnja izlazna točka cijelog sustava (Dodatna Tablica 1).

Najudaljenije lokacije pritoka udaljene su jedna od druge svega 20 km, dok je udaljenost između točaka uzorkovanja niz najduži tok Bijele rijeke do rijeke Korane samo 12 km.



Slika 15. Položaji točaka uzorkovanja na vodotocima u slatkovodnom povezanom ekosustavu.

Slivno područje Plitvičkih jezera uzorkovano je na 25 lokacija, od kojih se 18 nalazilo na pritocima (P1-18), 6 na međujezerskim tokovima (MT19-24), te 1 točka na rijeci Korani (K25). Karta je generirana pomoću softvera QGIS 3.24.

Na svakoj lokaciji uzorkovanja prikupljeno je ukupno 2 litre površinske vode u sterilne polikarbonatne (PC) boce. Uzorkovanje je obavljeno tijekom proljeća i ljeta 2019. i 2020. te tijekom zime 2020. i 2021. Uzorci vode filtrirani su peristaltičkom pumpom (Master flex L/S pumpa i kontrolor brzine, 6-600 rpm, 180 VDC, 0,1 HP model 07559/07, Cole-Parmer) na polikarbonatne filtere veličine pora od 0,22 mm (Whatman Nuclepore Track-Etch membrana;

promjer 47 mm, Njemačka). Filteri su odmah pohranjeni na - 20°C, a filtrati na 4°C do daljnje obrade.

3.1.2. Mjerenje okolišnih parametara

Prije uzorkovanja na svakoj lokaciji mjereni su fizikalni parametri (temperatura, pH, električna vodljivost, koncentracija otopljenog kisika u vodi, salinitet) *in situ* pomoću multisenzorske sonde (EXO3, YSI, SAD).

Otopljene koncentracije kationa (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+}) i aniona (Cl^{-} , SO_4^{2-} , NO_3^{-}) mjerene su u filtriranim uzorcima vode ionskom kromatografijom (Dionex ICS-6000 DC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Koncentracije otopljenog organskog ugljika (engl. *dissolved organic carbon*, DOC) mjerene su analizatorom za određivanje ugljika u tekućim uzorcima (HACH QbD1200, Colorado, SAD) u filtriranim uzorcima vode.

Mjerenja okolišnih parametara u laboratoriju odrađene su unutar 24 h od uzorkovanja prema gore navedenim metodama u Hidrokemijskom laboratoriju na Hrvatskom geološkom institutu u Zagrebu.

3.1.3. Izolacija DNA, PCR umnažanje, sekvenciranje i bioinformatička obrada sekvenci

Ukupna genomska DNA izolirana je iz 146 uzoraka DNeasy PowerWater kitom (Qiagen GmbH Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Izolirana i pročišćena DNA bila je pohranjena na - 20 °C do njenog daljnjeg korištenja.

Izolirana DNA korištena je za PCR umnažanje hipervarijabilne regije gena, koja kodira 16S rRNA, korištenjem univerzalnog para početnica za identifikaciju prokariota 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') [115] i 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') [116]. Izolirana DNA također je korištena za PCR umnažanje ITS2 gljivične rRNA korištenjem para početnica ITS3-Mix1-Mix2 (TCCTCCGCTTAyTgATAtGc), modificirana ITS3 Mix2 početnica iz Tedersoo48 nazvana ITS3-mkmix2 CAWCGATGAAGAACGCAG, i ITS4 (ekvimolarna mješavina cwmix1 TCCTCCGCTTAyTgATAtGc i cwmix2 TCCTCCGCTTAtTrATAtGc) [117].

Umnažanje DNA PCR-om provedeno je dodavanjem 3 µl izolirane DNA u konačni volumen od 25 µl koji je sadržavao 5 µl High Phusion HF pufera (New England BioLabs, Velika Britanija), 1,25 µl svake 10 µM početnice, 0,5 µl 10 mM dNTP-a (New England

BioLabs, Velika Britanija) i 0,25 µl Phusion High-Fidelity DNA polimeraze (New England BioLabs, Velika Britanija). Ostatak volumena sačinjavala je ultra čista PCR voda. Triplikati, odnosno tri PCR reakcije pripremljene su po uzorku, kako bi se smanjile pogreške PCR reakcije, te su potonje objedinjeni u jedan uzorak prije sekvenciranja [118].

Uvjeti umnažanja dijela 16S rRNA gena bili su: početna denaturacija (94 °C, 3 min), 30 ciklusa denaturacije (94 °C, 45 s), sparivanje početnica (52 °C, 60 s), produljenje lanca (72 °C, 90 s) i konačno produljenje lanca (72 °C, 10 min), dok su uvjeti umnažanja ITS rRNA bili: početna denaturacija (94 °C, 1 min), 35 ciklusa denaturacije (94 °C, 30 s), sparivanje početnica (52 °C, 30 s), produljenje lanca (68 °C, 30 s) i konačno produljenje lanca (68 °C, 10 min) [118].

Koncentracija izolirane DNA izmjerena je na nanofotometru (NanoPhotometer, N60/N50, IMPLLEN, Njemačka), a za negativnu kontrolu korištena je ultra čista PCR voda. Dužina dobivenih amplikona u PCR reakciji provjerena je gel elektroforezom na 1% agaroznom gelu u TAE (tris-acetat-EDTA) puferu s fluorescentnom bojom za gel (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, ThermoFisher scientific, SAD). Ultra čista PCR voda predstavljala je negativnu kontrolu, a referentna DNA ljestvica duljine 1 kb (New England BioLabs, Velika Britanija) stavljena je na gel kao referentni uzorak.

PCR produkti su barkodirani, pročišćeni normalizirani i pripremljeni za sekvenciranje (paired-end sequencing) kako je detaljno opisano u [118]. Svi amplikoni sekvencirani su na Illumina MiSeq platformi (V3, 600 ciklusa) u Središnjoj Mikrobiom Ustanovi Medicinskog sveučilišta u Beču (engl. *Joint Microbiome Facility of the Medical University of Vienna*, JMF).

Biblioteke skupova amplikona izdvojene su iz neobrađenih podataka sekvenciranja pomoću FASTQ procedure u BaseSpaceu (Illumina) sa zadanim parametrima, dopuštajući jednu neusklađenost za indekse biblioteke od 6 nukleotida (nt). Koristeći BBDuk alat (BBTools, Bushnell B, sourceforge.net/projects/bbmap) iz sirovih sekvenci su isključeni PhiX sljedovi koji pripadaju virusima. Svaka biblioteka skupa amplikona potom je demultipleksirana u pojedinačne biblioteke amplikona python paketom demultiplex (Laros JFJ, github.com/jfjlaros/demultiplex). Sekvence su filtrirane prema Phred koeficijentu kvalitete od 30 (99,9 %) te skraćene za dužinu barkodova, adaptera i početnica BBDuk alatom. ASV (engl. *Amplicon sequence variant*) tablica stvorena je koristeći standardni protokol iz paketa DADA2 (v. 1.14.1) [119] u R-u (v. 3.6.1.) [120] te je sadržavala referentne sekvence grupirane na 99 % sličnosti. Na kraju, ASV-ovima je dodijeljena taksonomija na temelju SILVA baze podataka SSU Ref NR 99 izdanje 138.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193283>) [121] i

UNITE all eukaryotes general FASTA verzija 8.2 [122] pomoću SINA verzije 1.6.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22556368>).

3.1.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza dobivenih ASV tablica provedena je korištenjem R programskog jezika (verzija 4.3.0.) [120]. Za obradu korišteni su Bionconductor (v. 3.14) paketi vegan (v. 2.5.7.) [123], phyloseq (v. 1.38.) [124], ggpubr (v. 0.6.0.) [125], corrplot (v. 0.92) [126] i dplyr [127]. Rezultati su vizualizirani pomoću paketa ggplot2 [128].

Beta raznolikost izmjerenih okolišnih parametara prikazana je PCA grafom (engl. *Prinipal Component Analysis*, engl. prijevod: analiza glavnih komponenti) na matrici udaljenosti iz normaliziranih podataka Z-score normalizacijom.

Prije statističke analize, ASV-ovi klasificirani kao eukarioti, mitohondriji ili kloroplasti uklonjeni su iz 16S rRNA gena ampikon seta podataka. Isto tako iz oba seta podataka (16S rRNA i ITS) su isključeni ASV-ovi kojima nije dodijeljena taksonomija na razini koljena, te ASV-ovi koji se pojavljuju samo jednom (engl. *singletons*) i dva (engl. *doubletons*) puta u cijelom skupu podataka.

Alfa raznolikost izračunata je na setovima podataka (16S rRNA i ITS) koji su svrgnuti na veličinu najmanjeg skupa podataka iz svakog seta pojedinačno (na veličinu uzorka s najmanjim brojem utvrđenih ASV-eva) te nasumičnom izvlačenju ASV-eva pri čemu se dobiju međusobno usporedivi uzorci (engl. *rarefied dataset*). Alfa raznolikost zatim je procijenjena kao bogatstvo (engl. *richness*) prema Chao1 [129], ravnomjernost (engl. *eveness*) [130], a raznolikost (engl. *diversity*) je procijenjena prema Shannonovom indeksu [131]. Test analize varijance (ANOVA) i Tukeyev HSD post hoc test korišteni su za testiranje razlika u alfa raznolikosti mikrobnih zajednica između različitih grupa.

Taksonomska zastupljenost proučena je micanjem ASV-ova kojima nije dodijeljena taksonomija te formiranjem grupe „Ostali“ (engl. *Others*), koja je uključivala sve grupe s relativnom zastupljenošću manjom od 1 %.

Beta raznolikost mikrobnih zajednica testirana je PERMANOVA testom (engl. *Permutational Multivariate Analysis of Variance*, engl. prijevod: permutacijska multivarijatna analiza varijance) kako bi se utvrdila statistički značajna razlika između različitih varijabli. Testiranje je provedeno na matricama različitosti dobivenih Bray-Curtis koeficijentom iz normaliziranih setova podataka Z-score-normalizacijom i vizualizirana PCoA grafom (engl.

Principal Coordinate Analysis, engl. prijevod: analiza glavnih koordinata). Okolišni parametri koji su pokazali potencijalni značajni utjecaj na oblikovanje strukture mikrobni zajednica ($p < 0,05$, PERMANOVA) izdvojeni su i ekstrapolirani na PCoA graf pomoću funkcije *envfit* iz paketa *vegan*.

U svrhu tumačenja kako sličnost u sastavu vrsta između dviju zajednica varira sa zemljopisnom udaljenošću koja ih razdvaja izračunat je odnos propadanja udaljenosti (engl. *Distance decay relationship*, DDR). Odnos je izračunat na temelju sličnosti zajednica prema Bray-Curtis indeksu nakon normalizacije seta podataka kroz kumulativno skaliranje zbroja. Za izračun korišten je metagenomeSeq paket [132]. Geografska udaljenost izračunata je pomoću „Vincenty“ (elipsoid) velikog kruga kako bi se uzela u obzir zaobljenost Zemlje. Za izračun geografske udaljenosti korišteni su paketi *enmSdm* [133] i *geosphere* (v1.5.10) [134]. DDR je izračunata između najudaljenijih lokacija uzorkovanja, odnosno najduljeg toka voda u sustavu Plitvičkih jezera, od Bijele Rijeke, kroz sve međujezerske vodotoke do rijeke Korane.

Odnos brojnosti i naseljenosti (engl. *abundance-occupancy relationship*, AOR) korištena je za determinaciju temeljnog središnjeg mikrobioma cjelokupnog povezanog sustava. AOR odražava korelaciju između broja mjesta koja vrsta zauzima i prosječne lokalne brojnosti jedinki te vrste na mjestu gdje se nalazi. Relativna zastupljenost svakog taksona izračunata je u cjelokupnom setu podataka, transformirana log transformacijom i prikazana na grafu u odnosu na proporciju diskretnih uzoraka u kojem se nalazi (ako je odnos brojnosti i naseljenosti iznosio 1, takson je zastupljen u svim uzorcima). Takse koje su pronađene u svim uzorcima smatrale su se temeljnim središnjim mikrobiomom. Jedinstveni i zajednički ASV-ovi prikazani su u Vennovim dijagramima za što je korišten je paket *ggVennDiagram* [135].

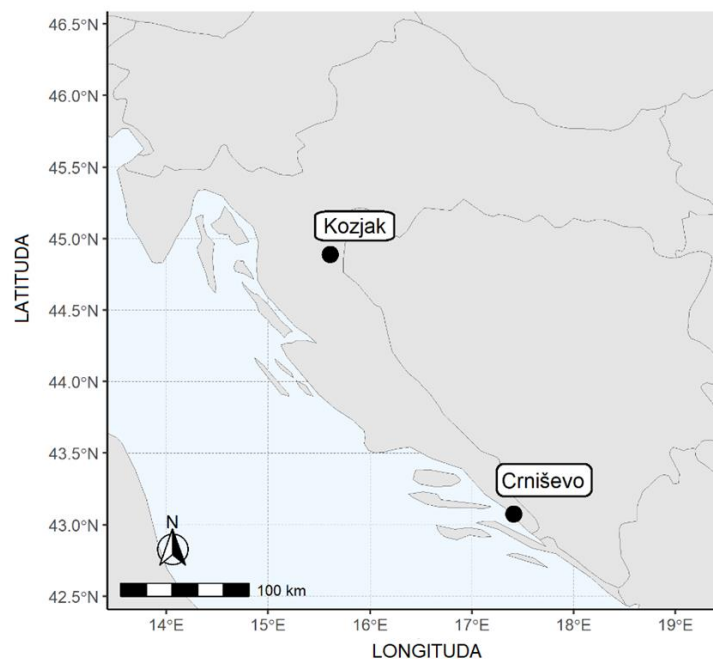
Za procjenu procesa sastavljanja mikrobni zajednica koristio se ekološki nulti model bioraznolikosti [32,136]. Indeksi β -najbližeg taksona (engl. *β -nearest taxon index*, β NTI) za prokariotsku i gljivičnu zajednicu izračunati su na temelju iz setova podataka (16S rRNA i ITS) koji su svrgnuti na veličinu najmanjeg skupa podataka iz svakog seta pojedinačno (na veličinu uzorka s najmanjim brojem utvrđenih ASV-eva) te nasumičnom izvlačenju ASV-eva pri čemu se dobiju međusobno usporedivi uzorci (engl. *rarefied dataset*) te filogenetskih stabala amplikona. Indeksi β -srednjeg najbližeg taksona (engl. *β -mean nearest taxon index*, β MNTD) izračunati su kako bi se provjerilo postoji li značajna razlika između molekularnog i filogenetskog obrata mikrobioloških zajednica. Nadalje je izračunat β NTI kao razlika između proučavanog β MNTD i nulte distribucije. β NTI veći od 2 ili manji od -2 ukazuju na dominaciju

determinističkih procesa (varijabilni ili homogeni odabir) sastavljanja zajednica. β NTI u vrijednosti od -2 do 2 ukazuje na dominaciju stohastički procesi kao što su homogenizirajuća disperzija, ograničenje disperzije ili slučajni proces (ekološki drift). Na temelju zastupljenosti mikrobnih zajednica izračunat je Raup-Crick (RC) beta raznolikosti kako bi se razlikovali stohastički procesi. Mikrobne zajednice sastavljene su procesom ograničenjem disperzije ako je RC bio veći od 0,95, homogenizirajućom disperzijom ako je RC manje od -0,95. Ako je vrijednost RC-a između -0,95 do 0,95 djeluje samo slučajni proces (ekološki drift).

3.2. Druga faza istraživanja

3.2.1. Područje istraživanja i uzorkovanje

U drugoj fazi istraživanja uzorkovana su dva prirodna krška jezera u Hrvatskoj: Kozjak i Crniševo (Slika 16).



Slika 16. Zemljopisni položaj uzorkovanih krških jezera u Hrvatskoj. Jezero Kozjak nalazi se unutar ekosustava Plitvičkih jezera u dinarskoj regiji, a Jezero Crniševo u Baćinskim jezerima u sredozemnoj regiji Hrvatske.

Jezero Kozjak najveće je i najdublje među Plitvičkim jezerima. Plitvička jezera čine slatkovodni povezani ekosustav sastavljen od potoka i 16 kaskadnih jezera, međusobno povezanih slapovima [137]. Plitvička jezera nalaze se u regiji Dinarskog krša u zapadnoj Hrvatskoj, koju karakterizira kontinentalna klima s hladnim zimama i suhim ljetima.

Jezero Crniševo je najdublje jezero iz skupine kriptodepresijskih jezera, Baćinskih jezera. Baćinska jezera smještena su u južnoj Sredozemnoj Hrvatskoj, okarakteriziranoj mediteranskom klimom s vrućim, suhim ljetima i blagim, vlažnim zimama. Jezero Crniševo ima djelomični dotok morske vode kroz porozni krš [138].

Uzorci vode prikupljeni su u proljeće i ljeto 2022., te zimu 2023. na dubini na kojoj je koncentracija otopljenog kisika bila otprilike 10 mg L^{-1} pomoću Ruttner uzorkivača vode 3L

(KC Denmark). Odmah nakon uzorkovanja 1 L vode stavljena je u staklene boce (DURAN, DWK Life Sciences, Engleska).

3.2.2. Mjerenje okolišnih parametara

Prije uzorkovanja na svakoj lokaciji mjereni su fizikalni parametri (temperatura, pH, električna vodljivost, koncentracija otopljenog kisika u vodi, salinitet) *in situ* pomoću multisenzorske sonde (EXO3, YSI, SAD).

Otopljene koncentracije kationa (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+}) i aniona (Cl^{-} , SO_4^{2-} , NO_3^{-}) mjerene su u filtriranim uzorcima vode ionskom kromatografijom (Dionex ICS-6000 DC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Koncentracije otopljenog organskog ugljika (engl. *dissolved organic carbon*, DOC) mjerene su analizatorom za određivanje ugljika u tekućim uzorcima (HACH QbD1200, Colorado, SAD) u filtriranim uzorcima vode.

Mjerenja okolišnih parametara u laboratoriju odrađene su unutar 24 h od uzorkovanja prema gore navedenim metodama u Hidrokemijskom laboratoriju na Hrvatskom geološkom institutu u Zagrebu.

3.2.3. Priprema fluorescentno označenih polisaharida

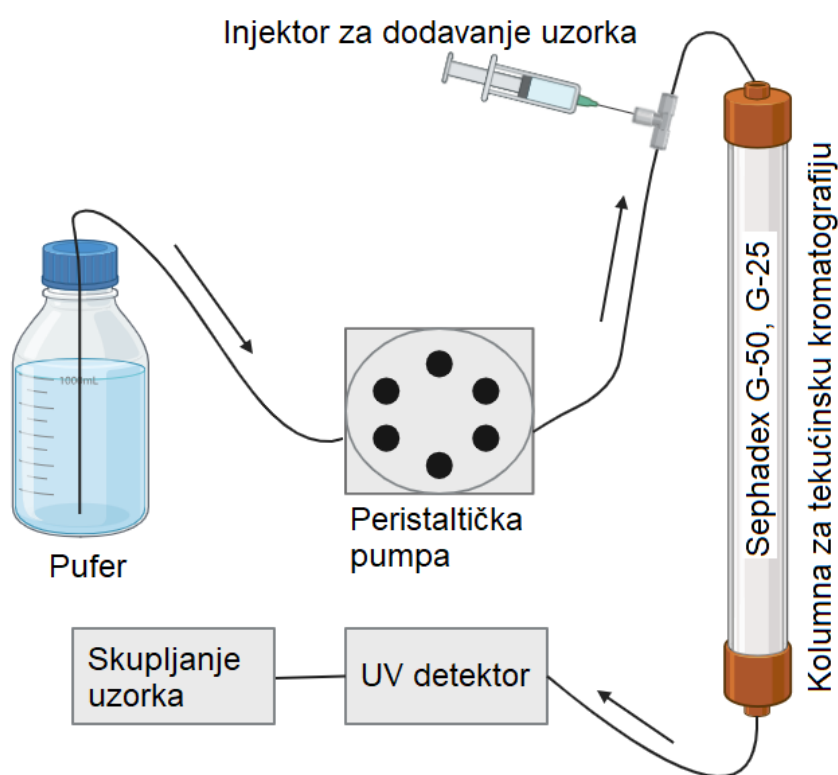
Boratni pufer pripremljen je miješanjem $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ u 1700 mL Mili-Q vode na magnetskoj miješalici povremeno dodavajući 6 M HCl. Na kraju je pH podešen na 8,0, a ukupni volumen na 2 L. Fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 100 mM NaCl, 3 mM 3 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ u 1950 mL Mili-Q vode. pH je na kraju podešen na 8,0, a ukupni volumen na 2 L.

Za gel filtracijsku kromatografiju korišteni su Sephadex gelovi, koji su nabubрили u jednom od navedenih pufera preko noći, a zatim su resuspendirani i ostavljeni da se slegnu, odlijevajući pufer koji je bio iznad njih kako bi se uklonile sve sitne čestice iz gelova prije izlivanja u stupce.

Za aktivaciju polisaharida 30 mg CNBr otopljeno je u 350 μL ultračiste vode, a 40 mg polisaharida otopljeno je u 2 mL ultračiste vode. Otopine CNBr-a i polisaharida su promiješane, a pH dobivene otopine se kontinuirano pratio narednih 5 minuta i dodatkom 0,2 M NaOH održavan je iznad 9,5. Cijela reakcijska smjesa (otprilike 2,45 mL) bila je ubrizgana u gel sustav permeacijske kromatografije koji se sastojao od multistatičke peristaltičke pumpe pričvršćene

na kolonu 18,3 x 1,0 cm napunjenu Sephadex G50 gela. Mobilna faza bio je boratni pufer, a brzina protoka je bila 1 ml/min. Frakcija koja odgovara praznom volumenu kolone (otprilike 5 mL ukupnog volumena) je sakupljena, pomiješana sa 6 mg fluoresceinamin (Sigma) i inkubirana na sobnoj temperaturi u mraku.

Nakon 18 h, svijetlo žuta otopina je ubrizgana u dva dijela na 26,5 x 1,0 cm kolonu napunjenu sa Sephadex G-50 gela uravnoteženog s fosfatnim puferom. Brzina protoka bila je 1 mL/min. Na stupcu je otopina bila podijeljena u dvije jarko obojene trake; skupljena je frakcija koja je eluirana u praznom volumenu kolone.



Slika 17. Shema proizvođnog sustava za FLAPS. Sustav uključuje peristaltičku pumpu, pufer, injektor za dodavanje uzorka, kolonu tekućinske kromatografije s odgovarajućim medijem, UV detektor i sakupljač uzorka (Izvor: vlastita izrada u Biorender.com prema [112]).

Koncentracija označenog polisaharida izračunata je mjerenjem apsorpcije (na 490 nm, u odnosu na niz standarda fluoresceinamina). Korišteni polisaharidi bili su: arabinogalaktan, hondroitin sulfat, fukoidan, laminarin, pululan, ksilan.

3.2.4. Inkubacije s fluorescentno označenim polisaharidima

Triplikati uzoraka vode od 1 L stavljeni su u sterilne, kiselinom isprane boce i inkubirani do 18 dana u mraku na *in situ* temperaturi s jednim od šest fluorescentno obilježenih polisaharida (FLAPS): arabinogalaktan, hondroitin sulfat, fukoidan, laminarin, pululan i ksilan. Svaki polisaharid dodan je u koncentraciji od 3,5 μmol ekvivalenta monomera. Odabrani polisaharidi te koncentracija u kojoj su dodani izabrani su zbog smislene usporedbe slatkovodnog i morskog okoliša. Dodatno, kao kontrolni uzorak korišten je uzorak vode bez dodatka polisaharida inkubiran pod istim uvjetima.

Svaka inkubacija je poduzorkovana 0., 3., 6., 12. i 18. dan inkubacije za analizu sastava mikrobne zajednice, FISH analizu i mjerenje aktivnosti izvanstaničnih enzima. Analiza je provedena pomoću sekvenciranja hipervarijabilne regije gena, koja kodira 16S rRNA gen, kvantifikacije sebične aktivnosti i fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH).

Za analizu mikrobne raznolikosti, 50 ml vode iz inkubacije je filtrirano na PC filter veličine pora 0,22 μm (Whatman Nuclepore Track-Etch membrana; promjer, 47 mm) i odmah pohranjeno na -20°C . Za analizu sebičnog mehanizma i FISH analizu, 15 ml i 5 ml uzoraka vode iz inkubacije, fiksiranih s konačnom koncentracijom od 1% formaldehida tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi, filtrirano je na polikarbonatni filter od 47 mm (veličina pora 0,2 μm) pomoću vakuumske pumpe. Poduzorak uzet 0. dana inkubacije filtriran je unutar 2 sata od dodavanja FLAPS-a uzorkovanoj vodi iz jezera.

Dodatno, negativne kontrole su također inkubirane pod istim uvjetima. Negativne kontrole uključivale su autoklavirane uzorke vode inkubirane s jednim od šest FLAPS-ova. Mikroskopske slike potvrdile su nepostojanje stanica u uzorcima i ne-degradiranih FLAPS-eva. (Dodatna slika 1).

3.2.5. Izolacija DNA, PCR umnažanje, sekvenciranje i bioinformatička obrada sekvenci

Ukupna genomska DNA izolirana je iz 210 uzoraka DNeasy PowerWater kitom (Qiagen GmbH Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Izolirana i pročišćena DNA bila je pohranjena na -20°C do njenog daljnjeg korištenja.

Izolirana DNA korištena je za PCR umnažanje hipervarijabilne regije gena, koja kodira 16S rRNA, korištenjem univerzalnog para početnica za identifikaciju prokariota 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') [115] i 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') [116].

Umnažanje DNA PCR-om provedeno je istim protokolom kao u prvoj fazi istraživanja opisanim u dijelu 3.1.3. Priprema PCR produkta za sekvenciranje, te sekvenciranje na Illumina MiSeq platformi i bioinformatička obrada provedeni su na način opisan u prvoj fazi istraživanja pod dijelom 3.1.3.

3.2.6. Kvantifikacija aktivnosti sebičnog mehanizma

Filtrirani i fiksirani uzorci vode iz inkubacija obojeni su 4',6-diamidin-2-fenilindolom (DAPI) dodanu u otopinu Citifluor/VectaShield (4:1). Stanice obojene polisaharidima vizualizirane su i pobrojane korištenjem potpuno automatiziranog mikroskopskog sustava za slikanje na mikroskopskom stalku Zeiss AxioImager.Z2 (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Göttingen, Njemačka) opremljenom hlađenom kamerom s naelektrizirano spregnutim uređajima (CCD) (AxioCam MRm + Colibri LED izvor svjetla, Carl Zeiss), tri svjetleće diode (LED koja emitira UV, $365 \pm 4,5$ nm za DAPI; LED koja emitira plavu boju, 470 ± 14 nm za FLAPS488, LED koja emitira crveno, $590 \pm 17,5$ nm za tyramide Alexa 594, FISH) u kombinaciji s HE-62 multifilter modulom koji se sastoji od trostrukog emisijskog filtra (425/50 nm, 527/54 nm, LP 615 nm, uključujući trostruki razdjelnik snopa od 395/495/610, CarlZeiss).

Slike su snimljene automatski s najmanje 30 vidnih polja po filtru korištenjem apokromatskog objektiva s uljnim imerzijskim povećanjem od 63X s numeričkom aperturom od 1,4 (Carl Zeiss) na odabranim valnim duljinama (DAPI, FLAPS, FISH). Fiksna vremena ekspozicije korištena su za snimanje u rasponu od 30 do 100 ms za DAPI, 40 i 150 ms za FLAPS, i 200 do 250 ms za FISH.

Kvantifikacija stanica provedena je pomoću softvera ACMETOOL (<https://www.mpi-bremen.de/automated-microscopy.html#section19794>) slijedeći [86]. Ukratko, stanice su pozitivno identificirane, odnosno, smatrane "obojene FLAPS-om" ako su pokazale pozitivan signal i na DAPI i FLA-PS (488) slikama. Dodatno, signali su morali imati minimalno preklapanje od 30%, minimalno područje od 17 ili 30 piksela ($0,17 - 0,3 \mu\text{m}^2$) (DAPI signal i FLA-PS signal, redom) i kao i minimalni omjer pozadine signala od 1.

3.2.7. Fluorescentna in situ hibridizacija

Filteri s fiksiranim uzorcima iz inkubacija izrezani su na sitne dijelove i na njima je provedena FISH analiza. FISH je proveden s odabiranim probama za kvantificiranje brojnosti

specifičnih filogenetskih skupina. Hibridizacijski pufer bio je sastavljen od 900 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,02% natrijevog dodecil sulfata, 10% dekstran sulfata (tež./vol.) i 1% (tež./vol.) reagensa za blokiranje (Boehringer; Mannheim, Njemačka), s 35% koncentracije formamida za sve korištene probe. Sve hibridizacije su provedene na 46°C u vlažnoj komori tijekom 3 sata, nakon čega je slijedilo ispiranje u puferu koji je sadržavao 700 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8), 5 mM EDTA (pH 8) i 0,01% natrijev dodecil sulfat na 48 °C.

Oligo-probe obilježene s Atto-594 četiri puta, korištene su za detekciju svih bakterija. Proba specifična za domenu EUB338-I korištena je za detekciju bakterija općenito [139], a EUB388-II i EUB338-III za specifično ciljanje bakterija iz koljena Planctomycetota i Verrucomicrobiota [140]. Probe EUB388-II i EUB 338-III imaju preklapanje konvergentnosti [140], što rezultira time da su određene bakterije pozitivne za obje probe. Konačno, proba CF19a korištena je za detekciju bakterija iz koljena Bacteroidota [114]. Detaljne informacije o korištenim probama navedene su u Dodatnoj tablici 2.

FISH analiza na mikroskopu provedena je na već opisani način, te je korištena treća svjetleća dioda (LED koja emitira crveno, $590 \pm 17,5$ nm za tyramide Alexa 594, FISH). Fiksno vrijeme ekspozicije korištene su za snimanje u rasponu od 200 do 250 ms. Konačno, preklapanje sva tri signala (DAPI, FISH, FLAPS) ukazivalo je na stanicu obojenu FLAPS-om identificiranu specifičnom FISH probom.

Svaka slika snimljena je na automatskom signalu, a sve bakterije koje su imale pozitivan signal na automatskim, DAPI i FLAPS kanalima prepoznate su kao cijanobakterije i isključene iz proračuna za sebični mehanizam (Dodatna slika 2). Zbog loše kvalitete filtera i nedostatka DAPI bojenja uzorci iz proljeća iz jezera Kozjak 6. dana iz inkubacija arabinogalaktana, hondroitin sulfata, laminarina i pululana nisu analizirani. Kao i ljetni uzorci iz jezera Kozjak 6. dana iz kontrolne inkubacije, arabinogalaktana i laminarina.

3.2.8. Super-rezolucijsko oslikavanje sebičnog mehanizma unosa polisaharida u bakterija

Sebični mehanizam razgradnje FLAPS-a vizualiziran je na Zeiss ELYRA PS.1 (Carl Zeiss) korištenjem 561, 488 i 405 nm lasera i BP 573-613, BP 502-538 i BP 420-480+LP 750 optičkih filtera. Z-stack slike snimljene su objektivom Plan-Apochromat 63×/1.4 Oil i obrađene softverom ZEN2011 (Carl Zeiss).

3.2.9. Statistička obrada podataka

Statistička analiza dobivenih ASV tablica provedena je korištenjem R programskog jezika (verzija 4.3.0.) [120]. Za obradu korišteni su Bionconductor (v. 3.14) paketi *vegan* (v. 2.5.7.) [123], *phyloseq* (v. 1.38.) [124], *ggpubr* (v. 0.6.0.) [125], *corrplot* (v. 0.92) [126] i *dplyr* [127]. Rezultati su vizualizirani pomoću paketa *ggplot2* [128].

Prije statističke analize, ASV-ovi klasificirani kao eukarioti, mitohondriji ili kloroplasti uklonjeni su iz amplikon seta podataka, te ASV-ovi kojima nije dodijeljena taksonomija na razini koljena, isto kao i ASV-ovi koji se pojavljuju samo jednom (engl. *singletons*) i dva (engl. *doubletons*) puta u cijelom skupu podataka. Dodatno, uzorci iz Kozjak iz ljeta od 0. dana iz inkubacija s hondroitin sulfatom, kao i uzorci od zime od 6. dana iz kontrolne inkubacije, te 0. dana iz inkubacije s hondroitin sulfatom i od 6. i 12. dana iz inkubacije s laminarinom uklonjeni su iz skupa podataka zbog niskih očitanih brojeva (<1000 očitavanja). Statistička obrada je provedena na 205 uzoraka.

Alfa raznolikost izračunata je na setu podataka koji su svrgnuti na veličinu najmanjeg skupa podataka iz svakog seta pojedinačno (na veličinu uzorka s najmanjim brojem utvrđenih ASV-eva), te nasumičnom izvlačenju ASV-eva pri čemu se dobiju međusobno usporedivi uzorci (engl. *rarefied dataset*). Alfa raznolikost zatim je procijenjena kao bogatstvo (engl. *richness*) pomoću funkcije *specnumber* i raznolikost (engl. *diversity*) je procijenjena prema Shannonovom indeksu [131].

Beta raznolikost mikrobnih zajednica testirana je ANOSIM testom (engl. *Analysis of similarity*, engl. prijevod: analiza sličnosti) kako bi se utvrdila statistički značajna razlika između različitih varijabli. Testiranje je provedeno na matricama različitosti dobivenih Bray-Curtis koeficijentom iz normaliziranih setova podataka Z-score-normalizacijom i vizualizirana NMDS grafom (engl. *Non-metric multi-dimensional scaling plots*, engl. prijevod: grafikoni nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja). Okolišni parametri koji su pokazali potencijalni značajni utjecaj na oblikovanje strukture mikrobnih zajednica ($p < 0,05$, PERMANOVA) izdvojeni su i ekstrapolirani na NMDS graf pomoću funkcije *envfit* iz paketa *vegan*.

Prije analiza bakterija uključenih u sebični mehanizam razgradnje FLAPS-eva, arheje i cijanobakterije su bile isključene. Taksonomska brojnost početne zajednice proučavana je na razini vrste uključujući sve svojte s relativnom brojnošću većom od 1%. Razina korištena za ovaj prag bila je razina koljena kako bi se učinkovito obuhvatio sastav zajednice. Zatim su identificirane i odabrane sekvence s relevantnim promjenama u usporedbi s početnim sastavom zajednice na razini roda. Brojnost sekvenci je praćena kroz vrijeme inkubacije.

Za usporedbu FISH rezultata s rezultatima analize mikrobne raznolikosti izračunata je apsolutna brojnost odabrane vrste. Apsolutna brojnost izračunata je na temelju formule:

$$\text{Broj stanica} = \text{Ukupan broj stanica (Uzorak Y)} \\ \times \frac{\text{Kumulativna relativna abundanca (Koljeno X u uzorku Y)}}{\text{Prosječan broj kopija 16S rRNA gena (Koljeno X)}}$$

*Ukupni broj stanica predstavlja broj stanica izbrojan tijekom DAPI, FLAPS i FISH bojenja. Ukupan broj stanica izbrojan je epifluorescentnim mikroskopom.

*Kumulativna relativna zastupljenost izračunata je zbrajanjem svih relativnih zastupljenosti određenog koljena u odabranom uzorku.

*Prosječni broj kopija 16S rRNA gena preuzet od [141].

Detaljan opis izračuna može se pronaći u [141].

Konačno, izračunata je Spearmanova korelacija ranga između rezultata FISH i izračunate apsolutne zastupljenosti odabranih koljena.

3.3. Treća faza istraživanja

3.3.1. Uzorkovanje, inkubacije s fluorescentno označenim polisaharidima i izolacija DNA

U trećoj fazi istraživanja korišteni su uzorci prikupljeni prilikom uzorkovanja za drugu fazu istraživanja u jezerima Kozjak i Crniševo (Slika 16). Uzorci za metagenomsko sekvenciranje čitave okoliše DNA odabrani su na temelju rezultata druge faze istraživanja. Uzorci s najvišim postocima sebičnog mehanizma detektiranog kod bakterija bili su izdvojeni. Stoga su odabrani uzorci iz inkubacija s pululanom i ksilanom iz Kozjaka i Crniševa, kao i iz ljetnih inkubacija sa svim polisaharidima iz Crniševo (Tablica 1). Početne inkubacije (od 0. dana) iz istog jezera i sezone skupljene su zajedno kako bi se dobile veće koncentracije DNA.

Ukupna genomska DNA izolirana je iz 25 uzoraka DNeasy PowerWater kitom na već opisani način. Izolirana i pročišćena DNA bila je pohranjena na -20 °C do njenog daljnjeg korištenja.

3.3.2. Metagenomsko sekvenciranje i bioinformatička obrada sekvenci

Metagenomsko sekvenciranje provedeno je u Novogene u Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo. Prvobitna koncentracija DNA u uzorcima određena je Qubitom. Sljedeći korak započinje fragmentacijom genomske DNA iz uzoraka na kratke fragmente. Dobiveni fragmenti su na A kraju popravljani (engl. *A-tailed*) i dalje ligirani s Illumina adapterima. Fragmenti s adapterima su razvrstani po veličini, amplificirani PCR-om i pročišćeni. Veličina i kvaliteta biblioteka provjerene su Qubitom i PCR-om u stvarnom vremenu za kvantifikaciju i bioanalizatorom za otkrivanje distribucije veličine. Kvantificirane biblioteke su objedinjene i sekvencirane na Illumina NovaSeq 6000 platformi (2 x 250 pb), prema efektivnoj koncentraciji biblioteke i potrebnoj količini podataka. Iz neobrađenih dobivenih sekvenci uklonjeni su adapteri, sekvence koja sadrže N > 10% (N predstavlja bazu koja se ne može odrediti) i sekvence s niskom kvalitetom (Qscore <= 5) kako bi se dobile čiste i kvalitetne sekvence.

Sekvence su dodatno filtrirane alatom BBDuk iz BBTools paketa. Filtrirane su baze s oba kraja, s kvalitetom ispod zadane granice (Q20), te su zadržane samo sekvence dulje od 100 pb. Spajanje parova sekvenci u duže sljedove nukleotida, kontige (engl. *contig*, proces *assembly*), izvršeno je alatom MEGAHIT [142] s minimalnom duljinom kontiga od 1000 nukleotida.

Tablica 1. Popis uzoraka iz eksperimenta s inkubacijama FLAPS-evima iz druge faze istraživanja korištenih u trećoj fazi istraživanja.

Naziv uzorka	Jezero	Sezona uzorkovanja	Dan inkubacije	FLAPS
K_P_0_PUL	Kozjak	Proljeće	0	Pululan
K_P_3_PUL	Kozjak	Proljeće	3	Pululan
K_P_18_PUL	Kozjak	Proljeće	18	Pululan
K_L_12_PUL	Kozjak	Ljeto	12	Pululan
K_L_18_PUL	Kozjak	Ljeto	18	Pululan
K_Z_0_PUL_KS	Kozjak	Zima	0	Pululan + Ksilan
K_Z_3_PUL	Kozjak	Zima	3	Pululan
K_Z_6_PUL	Kozjak	Zima	6	Pululan
K_Z_12_PUL	Kozjak	Zima	12	Pululan
K_Z_18_PUL	Kozjak	Zima	18	Pululan
K_Z_18_KS	Kozjak	Zima	18	Xylan
C_P_0_PUL_KS	Crniševo	Proljeće	0	Pululan + Ksilan
C_P_18_PUL	Crniševo	Proljeće	18	Pululan
C_L_0_PUL_KS	Crniševo	Ljeto	0	Pululan + Ksilan
C_L_12_PUL	Crniševo	Ljeto	12	Pululan
C_L_18_PUL	Crniševo	Ljeto	18	Pululan
C_Z_0_PUL_KS	Crniševo	Zima	0	Pululan + Ksilan
C_Z_3_PUL	Crniševo	Zima	3	Pululan
C_Z_18_PUL	Crniševo	Zima	18	Pululan
C_Z_18_KS	Crniševo	Zima	18	Ksilan
C_Z_0_A_F_H_L	Crniševo	Ljeto	0	Arabinogalaktan + Hondroitin sulfat + Fukoidan + Laminarin
C_Z_18_ARA	Crniševo	Ljeto	18	Arabinogalaktan
C_Z_18_FUK	Crniševo	Ljeto	18	Fukoidan
C_Z_18_HOS	Crniševo	Ljeto	18	Hondroitin sulfat
C_Z_18_LAM	Crniševo	Ljeto	18	Laminarin

Alat Bowtie2 [143] korišten je za mapiranje sekvenci na sastavljene genomske kontige kako bi se provjerila statistička vrijednost preklapanja sekvenci s kontigima u svim uzorcima.

Kontigi su zatim spojeni u pripadajuće binove (engl. *bins*, proces *binning*), skupove kontiga koji potencijalno pripadaju istom genomu, pomoću alata MaxBin [144].

Nakon toga, alat DAS Tool korišten je za poboljšanje kvalitete generiranih bin-ova integracijom više algoritama za binning. DIAMOND [145] je korišten za anotaciju bin-ova, odnosno bin-ovi su mapirani na referentnu bazu podataka radi identificiranja funkcionalnih gena i potencijalnih metaboličkih puteva.

Dereplikacija bin-ova obavljena je korištenjem alata dRep [146], čime su zadržani samo visokokvalitetni i neredundantni genomske binovi s prosječnim identitetom nukleotida od minimalno 95 %. Kompletanost genoma i kontaminacija bin-ova procijenjena je alatom CheckM [147].

Alat GTDB-Tk [148] korišten je za taksonomsku klasifikaciju genomske sekvenci prema GTDB (engl. *Genome Taxonomy Database*) bazi podataka. Posljednje mapiranje filtriranih sekvenci na reprezentativne bin-ove izvršeno je kako bi se dobio broj zastupljenosti sekvenci koje su dio visokokvalitetnih generiranih bin-ova odnosno MAG-ova (engl. *Metagenome Assembled Genomes*) unutar svih uzoraka.

3.3.3. Funkcionalna anotacija MAG-ova

Automatska anotacija genoma, odnosno identifikacija gena, proteina i funkcionalnih elemenata u genomu, napravljena je pomoću alata Prokka [149]. Konačno, alat dbCAN [150] korišten je za identifikaciju gena koji kodiraju enzime povezane s razgradnjom ugljikohidrata (CAZymes) na proteinskim datotekama generiranim Prokka-om. Ovaj alat uključuje HMMER, Diamond i dbCAN_sub za označavanje obitelji CAZymes. HMMER koristi Hidden Markov Models (HMMs) kako bi identificirao sekvence koje odgovaraju poznatim CAZyme obiteljima na temelju statističkog modeliranja. DIAMOND omogućuje brzo uspoređivanje proteinskih sekvenci s poznatim bazama podataka CAZymes koristeći algoritme slične BLAST-u, ali optimizirane za brzinu. dbCAN_sub integrira dodatne podatke o supstratima specifičnim za određene CAZyme obitelji, omogućujući preciznije funkcionalne anotacije i predviđanje enzima uključenih u razgradnju različitih polisaharida.

Osim toga, dbCAN uključuje i CAZyme Gene Clusters (CGC) analizu, koja pomaže u identifikaciji genskih klastera povezanih s razgradnjom ugljikohidrata, pružajući širi funkcionalni kontekst enzima unutar mikroorganizama.

3.3.4. Statistička obrada podataka

Statistička analiza provedena je na 24 uzroka zbog neuspjelog sekvenciranja uzorka C_Z_0_A_F_H_L, odnosno nedovoljne koncentracije DNA.

Sekvenciranje metagenomskih zajednica rezultiralo je s 1277 MAG-ova u jezeru Kozjak i 1230 MAG-ova u jezeru Crniševo. Nakon filtriranja binova s kompletnošću većom od 80% i kontaminacijom manjom od 10% preostalo je 996 MAG-ova u jezeru Kozjak i 1011 MAG-ova u jezeru Crniševo. Pragovi kompletnosti i kontaminacije binova od 80% i 10% pokazali su se kao najbolji odabir za dobivanje visoko kvalitetnih rekonstruktiranih genoma [151].

Statistička analiza dobivenih tablica provedena je korištenjem R programskog jezika (verzija 4.3.0.) [120]. Za obradu korišteni su Bionconductor (v. 3.14) paketi vegan (v. 2.5.7.) [123], ggpubr (v. 0.6.0.) [125], dplyr [127], tidyr [152] i tidyverse [152]. Rezultati su vizualizirani pomoću paketa ggtree [153] i ggplot2 [128].

Alfa raznolikost taksonomskih vrsta u bakterijskim zajednicama izračunata je na setu podataka koji su svrgnuti na veličinu najmanjeg skupa podataka iz svakog seta pojedinačno za svako jezero (engl. *rarefied dataset*). Alfa raznolikost zatim je procijenjena kao bogatstvo (engl. *richness*) pomoću funkcije *specnumber* i raznolikost (engl. *diversity*) je procijenjena prema Shannonovom indeksu [107]. ANOVA test i Tukeyev HSD post hoc test korišteni su za testiranje razlika u alfa raznolikosti bakterijskih zajednica između različitih sezona, polisaharida i dana inkubacija unutar pojedinog jezera.

Beta raznolikost bakterijskih zajednica i identificiranih gena testirana je PERMANOVA testom kako bi se utvrdila statistički značajna razlika između različitih sezona, polisaharida i dana inkubacije. Testiranje je provedeno na matricama različitosti dobivenih Bray-Curtis koeficijentom iz normaliziranih setova podataka Z-score-normalizacijom i vizualizirana PCoA grafom.

Taksonomska zastupljenost bakterija proučena je nakon micanja MAG-ova kojima nije dodijeljena taksonomija na razini koljena i roda. Zastupljenost taksonomskih vrsta izračunata je kao broj pojavljivanja pojedinog koljena ili roda u uzorcima, uz agregaciju prema sezoni, polisaharida i danu inkubacije. Na temelju toga izračunata je i relativna zastupljenost, koja prikazuje zastupljenost pojedinog koljena ili roda unutar svakog uzorka u odnosu na ukupnu brojnost.

Za analizu indikatorskih vrsta u uzorcima bakterijskih zajednica korišten je IndVal pristup [154] implementiran u paketu *indicspecies*. Ova metoda omogućava identifikaciju

mikroorganizama specifično povezanih s određenim uvjetima, u ovom slučaju s različitim sezonama i polisaharidima. Podaci su pripremljeni tako da su iz matrica relativne brojnosti rodova uklonjeni nenumerički stupci, a podaci konvertirani u numerički format. Metapodaci su filtrirani prema sezoni i dopunjeni informacijama o polisaharidima i danu inkubacije, nakon čega je kreirana varijabla *group*, koja kombinira sezonske uvjete s polisaharidima radi preciznije segmentacije podataka. Za izračun indikatorskih vrijednosti primijenjena je funkcija *multipatt()*, koja koristi 999 permutacija kako bi se testirala povezanost određenih rodova s polisaharidima unutar svake sezone. Rezultati su vizualizirani na bar dijagramu, gdje je na Y-os prikazana *IndVal* vrijednost, koja reflektira specifičnost i učestalost roda unutar određene grupe.

Analiza CAZy gena provedena je pomoću podataka iz više bioinformatičkih alata (HMMER, dbCAN_sub i DIAMOND). Prvo su filtrirani geni koji su identificirani s dva od ovih alata. Ukupna brojnost CAZy gena izračunata je sumom gena identificiranih dbCAN alatom. Kruskal-Wallis test i pairwise wilcox test korišteni su za testiranje razlika u brojnosti gena između različitih sezona, polisaharida i dana inkubacija unutar pojedinog jezera. Geni su zatim kategorizirani u šest glavnih CAZy klasa: GH, GT, PL, CE, AA i CBM. Za kvantifikaciju, izračunata je učestalost CAZy klasa u uzorcima, uz agregaciju prema sezoni, polisaharidu i danu inkubacije unutar pojedinog jezera. Zatim su unutar svakog jezera, sezone i polisaharida izdvojeni 10 najčešćih CAZy gena u pojedinom uzorku.

Filogenetsko stablo izrađeno je koristeći metodu UPGMA (engl. *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) na temelju Bray-Curtis distance matrice. UPGMA stablo korišteno za grupiranje uzoraka u klastere na temelju njihovih zajedničkih gena identificiranih alatom dbCAN_sub. U pojedinom uzorku identificirani su najdominantniji CAZy gena iz dbCAN_sub alata, kao i rodovi unutar odabranih koljena u kojima su bili prisutni najzastupljeniji geni.

Na kraju su izdvojeni geni identificirani isključivo u pojedinim sezonama, odnosno polisaharidima unutar svakog jezera i rodovi bakterija koji ih nose. Unutar jezera i sezona gdje su analizirani uzorci iz inkubacija s različitim polisaharidima izdvojeni su geni jedinstveni za pojedini polisaharid i rodovi bakterija koji ih nose.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Prva faza istraživanja

4.1.1. Okolišni parametri povezanog slatkovodnog ekosustava

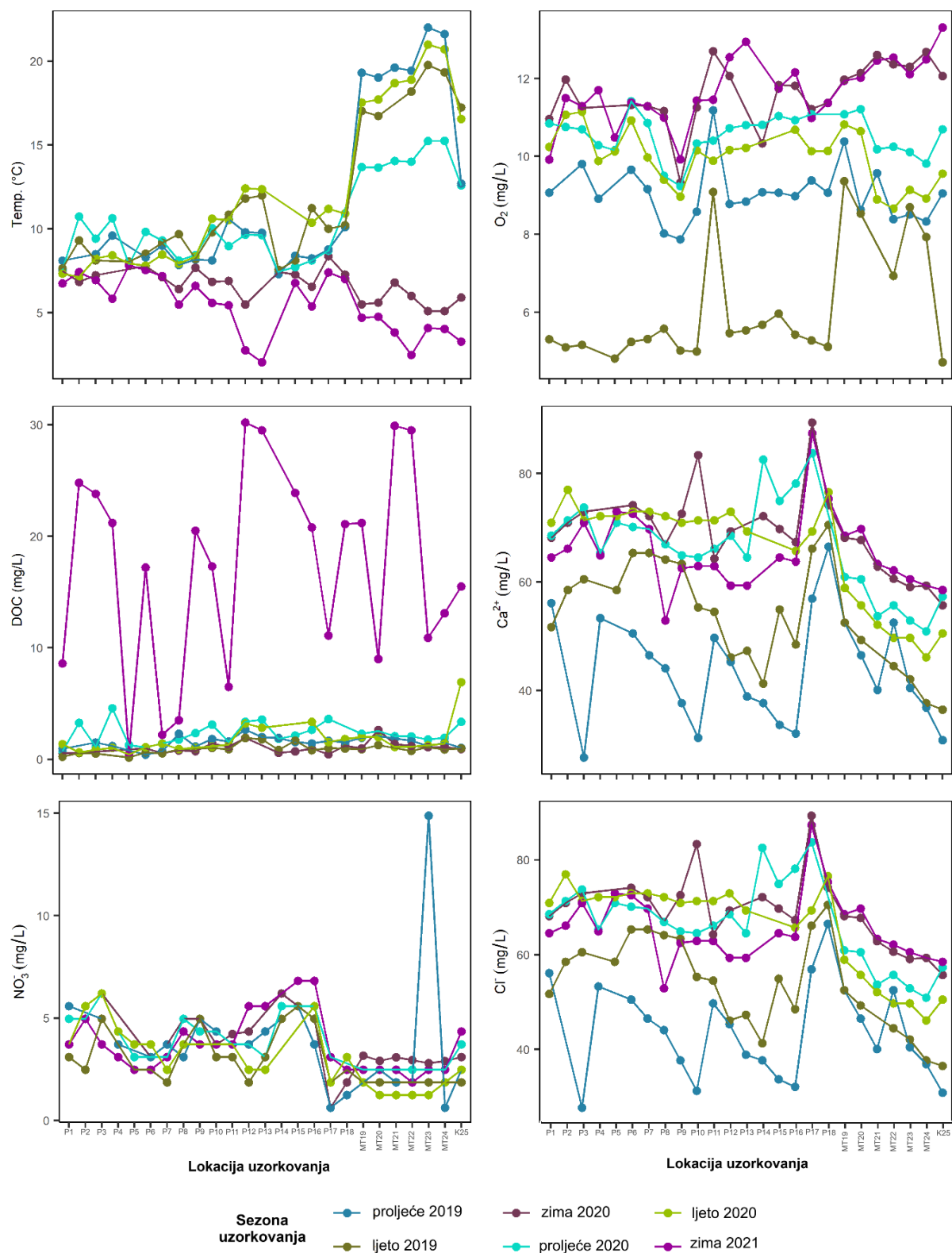
Temperatura vode izmjerena u pritocima varirala je od 2 °C (zima 2021.) do 12 °C (ljetno 2020.) te je bila stabilnija u odnosu na temperaturu izmjerenu u međujezerskim pritocima gdje je varirala od 2 °C (zima 2021.) do 22 °C (proljeće 2019.). Najniža izmjerena temperatura u Korani bila 3 °C (zima 2021.) dok je najviša bila 17 °C (ljetno 2019.; Slika 18).

Najniža izmjerena koncentracija O₂ u pritocima iznosila je 4,8 mg/L (ljetno 2019.), a najviša 12,9 mg/L (zima 2021.). Slično tome, najniže izmjerene koncentracije u međujezerskim potocima i Korani bile su 6,9 mg L⁻¹ i 4,7 mg L⁻¹ (ljetno 2019.), dok su najviše bile 12,6 (zima 2020) i 13,3 mg L⁻¹ (zima 2021.; Slika 18).

Izmjerene koncentracije DOC na svim lokacijama od proljeća 2019. do 2020. varirale su između 0,8 do 3,3 mg L⁻¹. U Korani je tijekom ljeta 2020. izmjerena koncentracija DOC-a bila 6,9 mg L⁻¹. Najviše koncentracije DOC-a izmjerene su u zimi 2021. i iznosile su 17,3 mg L⁻¹ u pritocima, 18,9 mg L⁻¹ u međujezerskim tokovima i 15,5 mg L⁻¹ u Korani (Slika 18).

Generalno su najniže koncentracije Ca²⁺ izmjerene u proljeće 2019., dok su najviše izmjerene na zimu (zima 2020. u međujezerskim potocima 89,4 mg L⁻¹ i zima 2021. 69,4 mg L⁻¹). Izmjerene koncentracije NO₃⁻ bile su vrlo niske i varirale su između 0,6 mg L⁻¹ (u pritocima na zimu 2020.) i 6,8 mg L⁻¹ (u pritocima na zimu 2021.). Jedino je na proljeće 2019. u međujezerskim potocima izmjerena viša koncentracija od 14,9 mg L⁻¹ (Slika 18).

Količine padalina razlikovale su se unutar sezone te i godina. Tako je, u svibnju 2019. izmjerena količina od 421,2 mm padalina, a u svibnju 2020. 161,5 mm. Ljetni uzorci 2019. uzeti su početkom rujna tijekom sušne sezone, s količinom oborine od 52,3 mm, dok su ljetni uzorci 2020. uzeti sredinom rujna, kada je količina oborine već dosegla 217,8 mm. Zimski uzorci uzeti su u veljači, koja je bila sušna sezona 2020. godine s količinom oborine od 44,8 mm, dok je 2021. godine u istom razdoblju pao snijeg, a količina oborine iznosila je 90,4 mm (Dodatna Tablica 3).



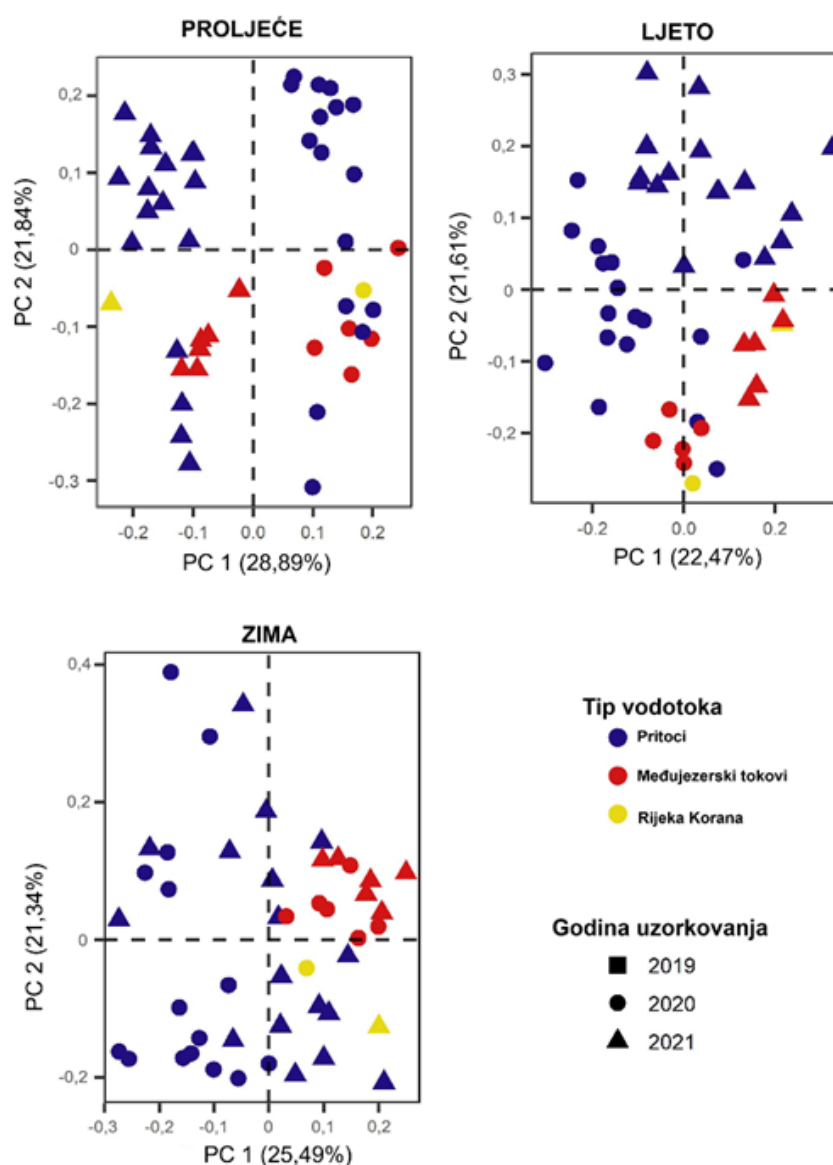
Slika 18. Okolišni parametri (temperature, koncentracije O₂, DOC, Ca²⁺, NO₃⁻ i Cl⁻) izmjereni na 25 lokacija unutar slatkovodnog povezanog ekosustava Plitvičkih jezera.

Različite boje predstavljaju sezone uzorkovanja.

Na temelju Pearsonovog koeficijenta korelacije temperatura je negativno korelirala s DOC ($R^2 = 20,39$, $P = 0,05$), O_2 ($R^2 = 20,38$, $P = 0,05$) i Ca^{2+} ($R^2 = 20,45$, $P = 0,05$), dok su DOC i O_2 ($R^2 = 0,40$, $P = 0,05$) pozitivno korelirali (Dodatna slika 3).

Analiza glavnih komponenti (PCA) pokazala je podjelu uzoraka prema godini uzorkovanja u sezonama proljeća i ljeta, dok se uzorci u sezoni zime nisu grupirali prema godini uzorkovanja (Slika 19; Dodatna slika 4). Proljetni i ljetni uzorci prikupljeni su u različitim dijelovima sezona, pri čemu su zbog velikih razlika u količinama padalina bile očekivane jasne razlike među godinama uzorkovanja. Nasuprot tome, u zimskim uzorcima padaline su se između godina razlikovale znatno manje (Dodatna tablica 3). Uz to, u proljetnim i ljetnim uzorcima zabilježene su manje razlike u okolišnim parametrima, što je vjerojatno doprinijelo opaženim statistički značajnim razlikama među godinama. Najizraženija razlika među godinama u zimskom razdoblju odnosila se na koncentraciju DOC-a, no ta promjena nije rezultirala značajnim grupiranjem uzoraka prema godini (Slika 19). Ovakvi rezultati pokazuju koliko je jak utjecaj različitih klimatskih uvjeta između različitih godina na okolišne parametre. Ipak, za pouzdaniju procjenu različitih obrazaca ponašanja vodenih ekosustava trebalo bi provesti višegodišnji monitoring mjerenja okolišnih parametara i povezati podatke s meteorološkim i hidrološkim parametrima [155].

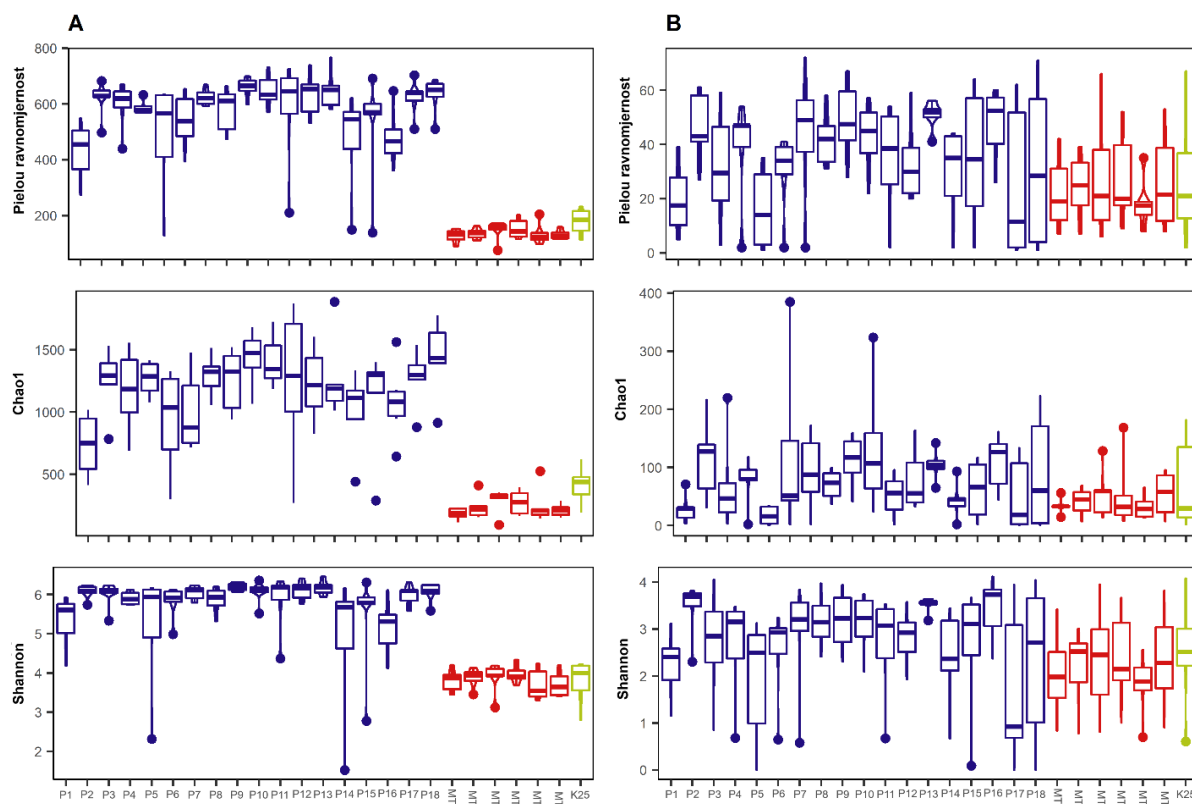
U proljeće nije bilo grupiranja uzoraka prema mjestu uzorkovanja, a na ljeto i zimu vidljivo je slabo grupiranje uzoraka iz međujezerskih potoka i pritoka (Slika 19). Općenito su se uzorci međujezerskih potoka grupirali bliže u usporedbi s uzorcima pritoka, koji su imali veće razlike međusobno. Uzorci iz rijeke Korane u proljeće su se grupirali prema godini uzorkovanja s ostalim uzorcima, a na ljeto su bili grupirani s uzorcima međujezerskih potoka i na zimu s uzorcima pritoka (Slika 19).



Slika 19. Analiza glavnih komponenti (PCA) ordinacija okolišnih parametara izmjerenih tijekom istraženog razdoblja podijeljena po sezonama uzorkovanja. Različite boje predstavljaju vrste tokova, a oblici godine uzorkovanja.

4.1.2. Sastav mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu

Alfa raznolikost prokariotskih zajednica imala je više vrijednosti u proljeće i zimu u uzorcima iz pritoka nego u uzorcima iz međujezerskog potoka ili rijeke Korane, dok su vrijednosti ljeti bile relativno iste za sve tipove potoka (Slika 20; detaljnije u Dodatnoj slici 5).



Slika 20. Alfa raznolikost prokariotskih (A) i gljivičnih (B) zajednica na 25 lokacija u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera određena indeksima za ravnomjernost prema Pieolu, brojnost prema Chao1 i raznolikost prema Shannonu. Različite boje označuju uzorkovane vodotoke (plavo – pritoci, crveno – međujezerski potoci, žuto – rijeka Korana).

Kratice uzoraka odnose se na različita mjesta uzorkovanja.

Tukeyev test (HSD) potvrdio je značajnu razliku prokariotskih zajednica pritoka od međujezerskih potoka i rijeke Korane u proljeće ($p = 0,05$), dok se uzorci iz međujezerskih uzoraka i rijeke Korane nisu značajno razlikovali jedni od drugih u istoj sezoni (Tablica 2).

Tablica 2. TukeyHSD test alfa raznolikosti mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera. Značajna razlika izračunata je između vrsta vodotoka unutar svake sezone uzorkovanja.

	BAKTERIJE	GLJIVE
	<i>p</i> vrijednost	<i>p</i> vrijednost
ZIMA		
Chao1		
pritoci-međujezerski tokovi	1,58E-11	0,01
pritoci-rijeka Korana	8,85E-04	0,31
međujezerski tokovi-rijeka Korana	9,01E-01	0,03
Shannon		
pritoci-međujezerski tokovi	1,60E-09	0,0000055
pritoci-rijeka Korana	4,44E-04	0,94
međujezerski tokovi-rijeka Korana	9,03E-01	0,098
Pileou ravnomjernost		
pritoci-međujezerski tokovi	1,50E-12	0,00074
pritoci-rijeka Korana	6,40E-05	0,97
međujezerski tokovi-rijeka Korana	9,90E-01	0,29
LJETO		
Chao1		
pritoci-međujezerski tokovi	0,42	0,93
pritoci-rijeka Korana	0,9	0,99
međujezerski tokovi-rijeka Korana	0,98	0,95
Shannon		
pritoci-međujezerski tokovi	0,99	0,51
pritoci-rijeka Korana	0,92	0,83
međujezerski tokovi-rijeka Korana	0,92	0,99
Pileou ravnomjernost		
pritoci-međujezerski tokovi	0,9	0,49
pritoci-rijeka Korana	0,92	0,92
međujezerski tokovi-rijeka Korana	0,98	0,98
PROLJEĆE		
Chao1		
pritoci-međujezerski tokovi	8,5E-11	0,83
pritoci-rijeka Korana	0,032	0,18
međujezerski tokovi-rijeka Korana	0,35	0,32
Shannon		

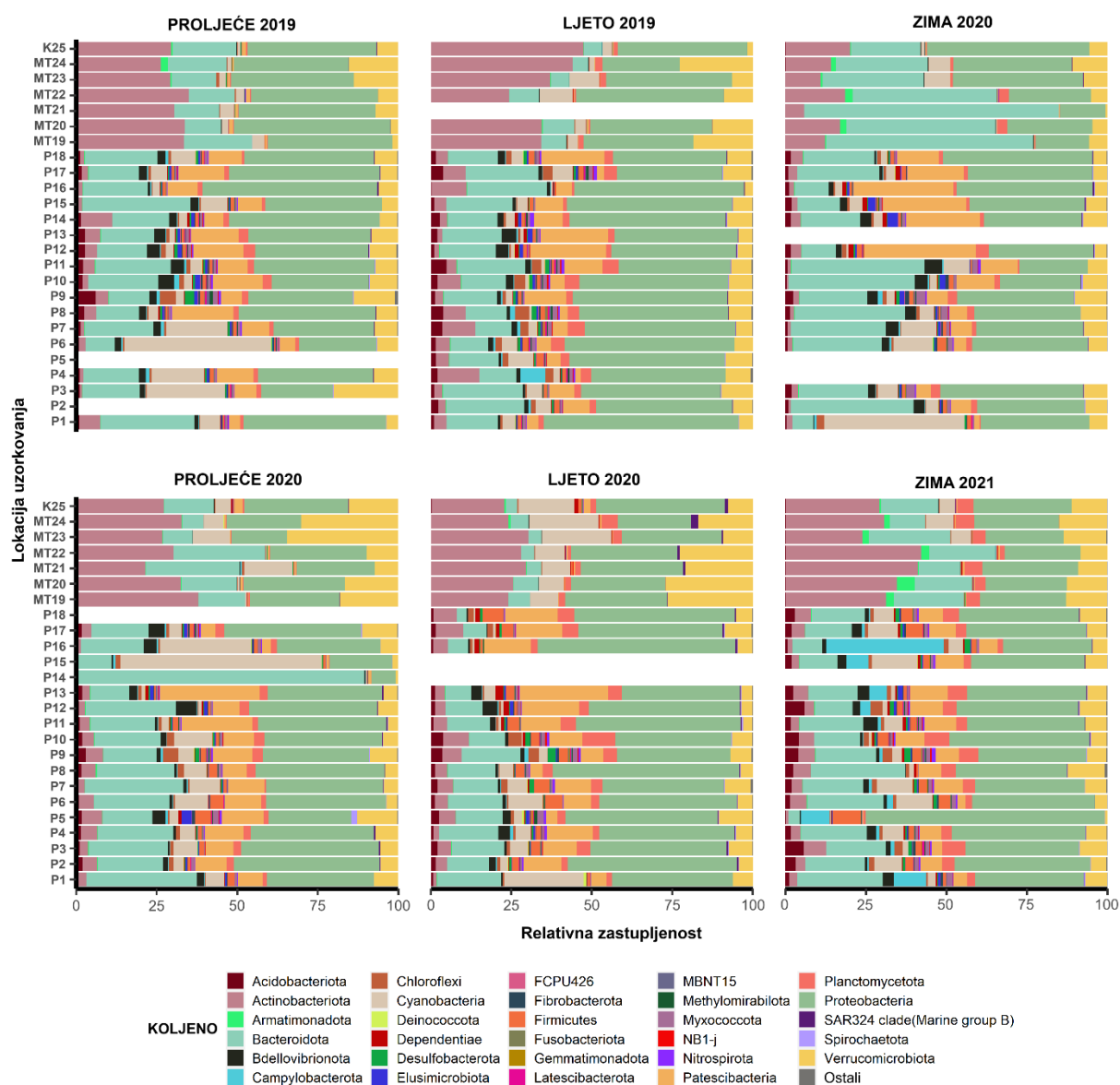
pritoci-međujezerski tokovi	0,00000047	0,99
pritoci-rijeka Korana	0,062	0,13
međujezerski tokovi-rijeka Korana	0,86	0,16
Pileou ravnomjernost		
pritoci-međujezerski tokovi	1,2E-12	0,98
pritoci-rijeka Korana	0,00073	0,07
međujezerski tokovi-rijeka Korana	0,66	0,1

Značajna razlika između svih vrsta vodotoka dokazana je na zimu, a na ljeto nisu otkrivene značajne razlike (Tablica 2).

Veće vrijednosti alfa raznolikosti zajednice gljiva uočene su u uzorcima iz pritoka prikupljenih tijekom zime, dok su vrijednosti u proljeće i ljeto bile slične onima u međujezerskim potocima i uzorcima rijeke Korane (Slika 20; Dodatna slika 6). Tukeyjev test pokazao je značajne razlike samo između pritokama i međujezerskim potocima zimi ($p = 0,05$; Tablica 2).

Unutar prokariotske zajednice utvrđeno je 54 različitih koljena (Slika 21). Najzastupljenija koljena u prokariotskoj zajednici bili su bakterijska koljena Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria, Patescibacteria, Proteobacteria i Verrucomicrobiota, dok su arheje bile rijetko prisutne.

Relativne zastupljenosti bakterijskih koljena Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria i Verrucomicrobiota sustavno su se povećavale od pritoka prema međujezerskim potocima (Slika 21). Unutar pritoka, uz već navedena koljena, bakterije iz koljena Bdellovibrionota pojavljivala su se u većoj relativnoj zastupljenosti kroz sva godišnja doba. Veća zastupljenost Cyanobacteria uočena je u proljetnim uzorcima, Firmicutes i Planctomycetota u ljeto 2020. te Campylobacterota u zimi 2021. U međujezerskim potocima, relativne zastupljenosti Bacteroidota bile su niže ljeti, dok su one Cyanobacteria bile veće. Uzorci rijeke Korane pokazali su sličan sastav bakterijske zajednice kao međujezerski potoci, te su jednako pratili promjene kroz godišnja doba (Slika 21).

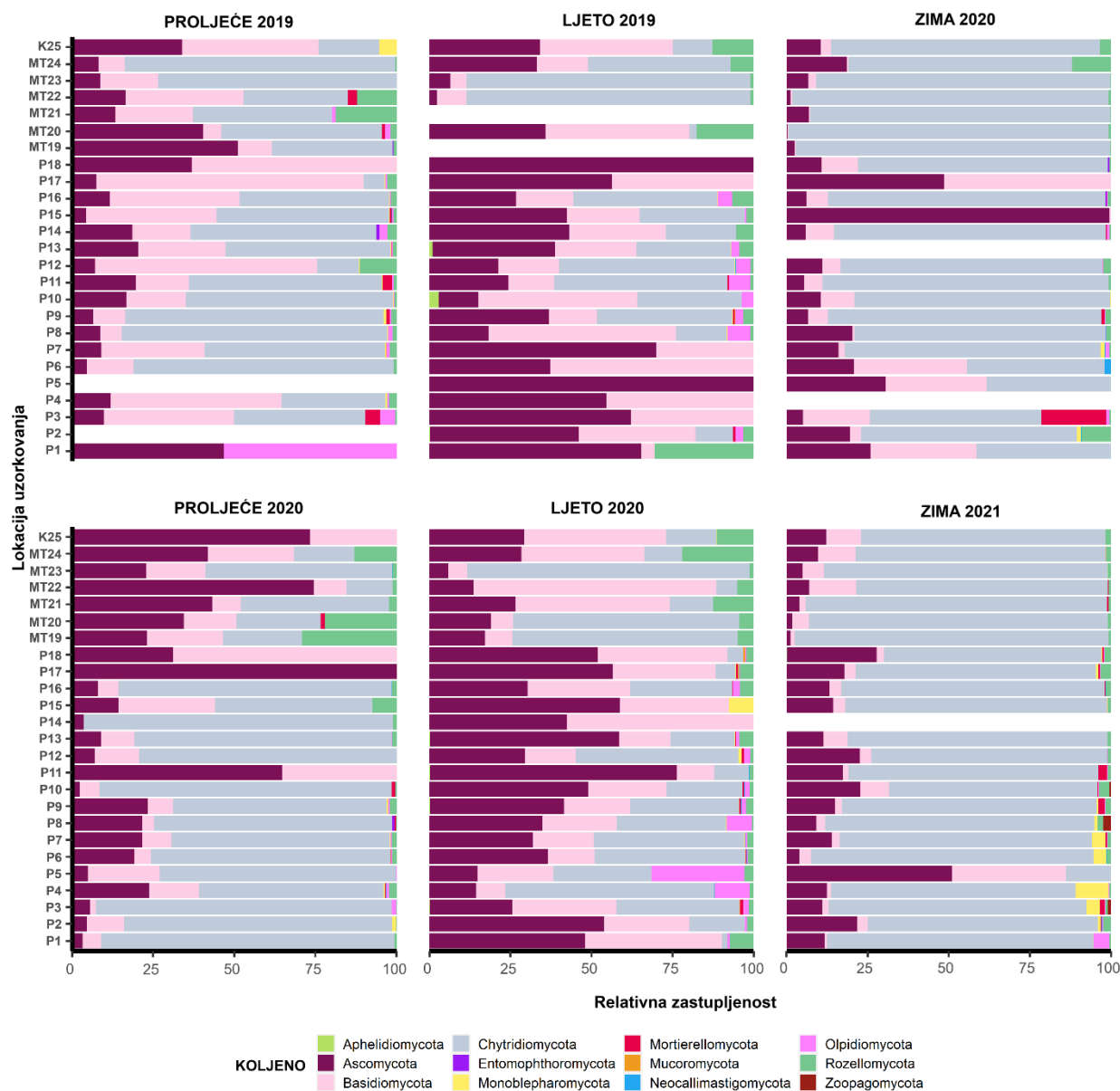


Slika 21. Relativna zastupljenosti ukupne strukture prokariotske zajednice (razina koljeno) u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera, podijeljena po sezonama uzorkovanja. Kratice uzoraka odnose se na mjesta uzorkovanja. Skupina "Ostalo" sadrži koljena s relativnom zastupljenošću manjom od 1%.

Unutar zajednice gljiva utvrđeno je 12 različitih koljena (Slika 22). Najzastupljenija koljena u gljivičnoj zajednici bila su Ascomycota, Basidiomycota i Chytridiomycota.

Gljive iz koljena Chytridiomycota dominirale su na zimu u gotovo svim tipovima potoka, dok su gljive iz koljena Ascomycota i Basidiomycota imale veću relativnu zastupljenost u ljetnim uzorcima u svim tipovima potoka (Slika 22). U proljetnim sezonama Chytridiomycota

je dominirala u pritocima, dok su u proljeće 2020. Ascomycota i Basidiomycota dominirale u međujezerskim potocima i rijeci Korani.



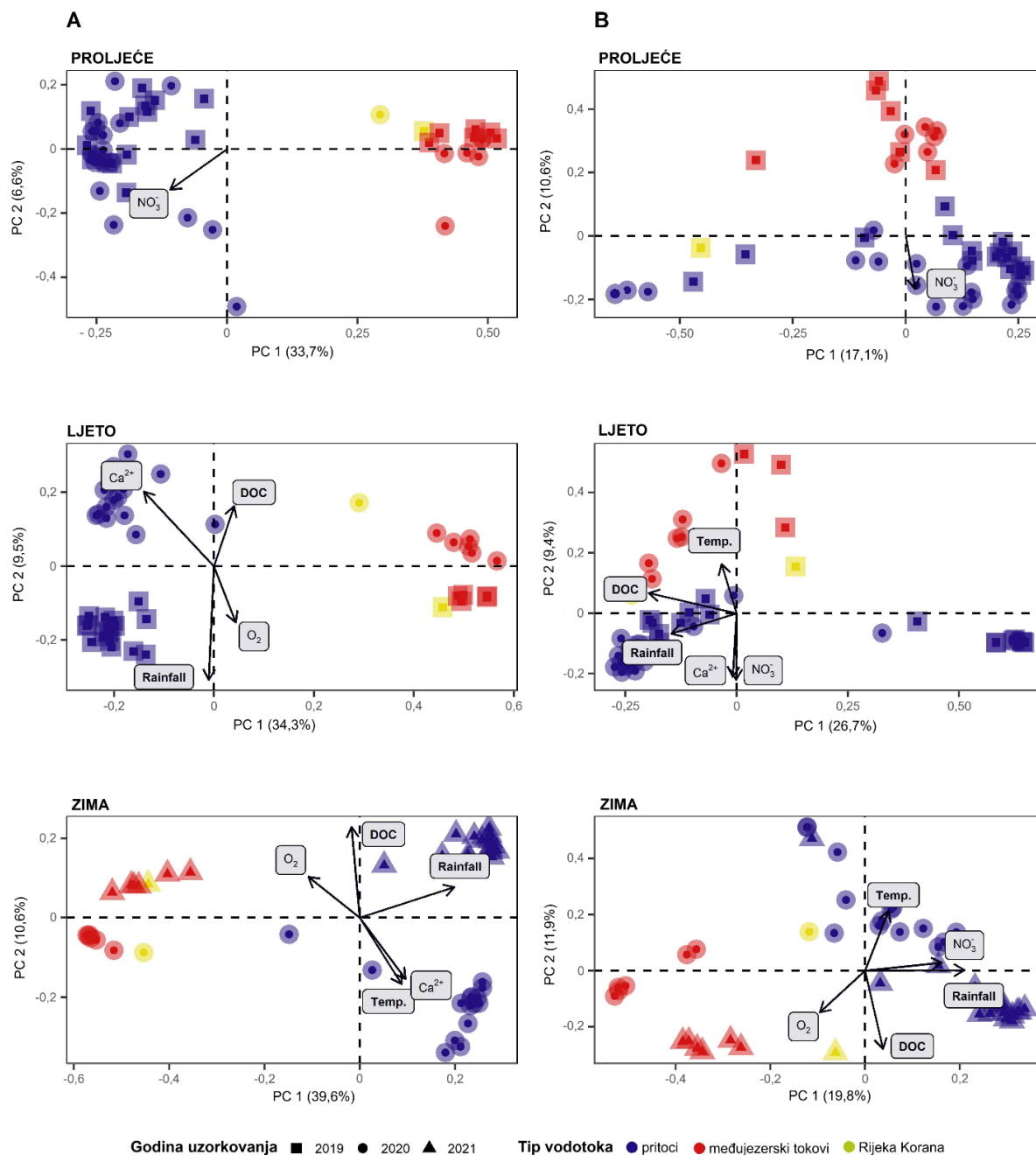
Slika 22. Relativna zastupljenost ukupne strukture zajednice gljiva (razina koljeno) u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera, podijeljena po sezonama uzorkovanja. Kratice uzoraka odnose se na mjesta uzorkovanja. Skupina "Ostalo" sadrži koljena s relativnom zastupljenošću manjom od 1%.

4.1.3. Prostorno-vremenske promjene mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu

Multivarijatna analiza PcoA rađena na indeksu različitosti između svih prikupljenih uzoraka pokazala je razlike između mikrobnih zajednica temeljene prvenstveno na vrsti vodotoka koji su uzorkovani (Dodatna slika 7).

Unutar prokariotske zajednice ljeti i zimi uzorci su se grupirali prema godini uzorkovanja, dok nije bilo razlike između uzoraka iz različitih godina u proljeće (Slika 23A). Prokariotske zajednice rijeke Korane grupirale su se sa zajednicama međujezerskih potoka.

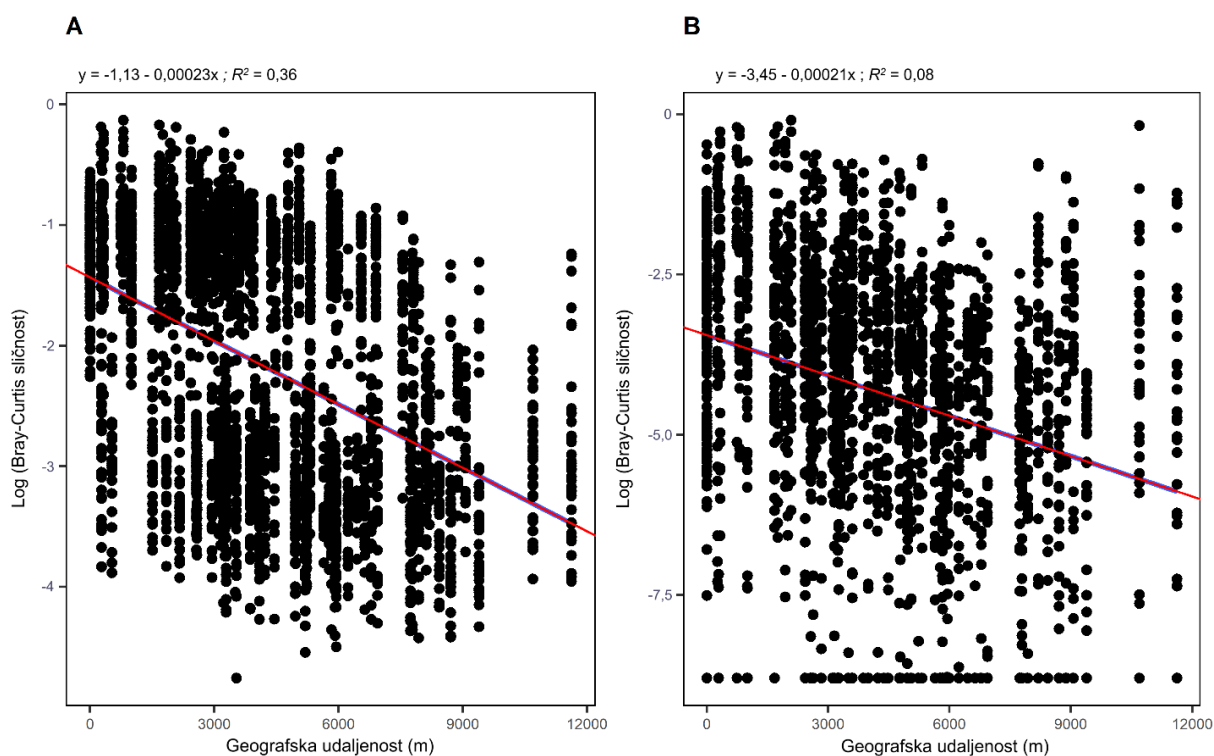
Najizraženije grupiranje između uzoraka iste vrste vodotoka na temelju godine uzorkovanja unutar zajednice gljiva bilo je zimi, dok je u proljeće i ljeto utjecaj godine uzorkovanja bio značajan, ali manji (Slika 23B). Zajednice gljiva rijeke Korane su se u proljeće i zimu grupirale sa zajednicama pritoka, a ljeti sa zajednicama međujezerskih potoka.



Slika 23. Analiza glavnih koordinata (PCoA) bakterijskih (A) i gljivičnih (B) zajednica β raznolikosti na temelju Bray-Curtisove različitosti podijeljene po sezoni uzorkovanja. Utjecaj različitih vrsta vodotoka i sezone uzorkovanja na klasteriranje uzoraka testiran je permutacijskom multivarijantnom analizom varijance (PERMANOVA). Različite boje predstavljaju vrste vodotoka, a različiti oblici predstavljaju godine uzorkovanja.

4.1.4. Glavni pokretači formiranja mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu

Sličnost mikrobnih zajednica iscertana je kao funkcija geografske udaljenosti između najudaljenijih točaka uzorkovanja kako bi se istražile biogeografske razlike mikrobnih zajednica duž longitudinalnog gradijenta (Slika 24). Geografska udaljenost između najudaljenijih točaka uzorkovanja bila je 12 km. Općenito, sličnost mikrobnih zajednica između uzoraka smanjivala se s povećanjem geografske udaljenosti (nagib zajednice prokariota, -0,00023; nagib zajednice gljiva, -0,00021). Linearna regresija DDR-a pokazala je veće smanjenje sličnosti zajednica unutar prokariotskih zajednica s povećanjem geografske udaljenosti (Slika 24A), dok je isto opažanje primijećeno za zajednice gljiva s nešto manjim vrijednostima (Slika 24B).



Slika 24. Sličnost zajednice izračunata na temelju Bray-Curtis sličnosti između uzoraka s obzirom na geografsku udaljenost (m). (A) Bakterijska zajednica. (B) Gljivična zajednica. Sličnost zajednica procijenjena je isključivo između uzoraka najdužih pritoka: Bijeke Rijeke s međujezerskim potocima i rijeke Korane. Plave linije ilustriraju linearne modele izračunate za podskup razmatranih uzoraka, a crvene linije predstavljaju ukupnu linearnu regresiju kada su uključeni svi uzorci.

Utjecaj okolišnih parametara na formiranje mikrobnih zajednica unutar slatkovodnog povezanog ekosustava istraživao je ekstrapolacijom istih na PcoA graf (Slika 23). Na sastav prokariotske i zajednice gljiva utjecali su promjena temperatura, koncentracije DOC, O₂, Ca²⁺, NO₃⁻ ili količine padalina. Promjena koncentracija NO₃⁻ je utjecala na uzorke obje zajednice pritoka u proljeće.

Prokariotske zajednice pritoka na ljeto 2019. su bile pod utjecajem količine padalina, a na ljeto 2020. pod utjecajem promjene koncentracija Ca²⁺. Temperatura i promjena koncentracija Ca²⁺ utjecali su na prokariotske zajednice pritoka na zimu 2020., dok su količine padalina i promjena koncentracija DOC utjecali na iste na zimu 2021. Na prokariotske zajednice međujezerskih potoka na ljeto 2019. utjecala je promjena koncentracije O₂, na ljeto 2020. promjena koncentracije DOC, a na zimu 2021. promjena koncentracija O₂.

Promjene koncentracija NO₃⁻ i Ca²⁺ te količina padalina utjecali su na zajednice gljiva pritoka ljeti, dok su temperatura i promjena koncentracije NO₃⁻ utjecali na iste na zimu 2020. te količina padalina i promjena koncentracija DOC na zimu 2021. Zajednice gljiva u međujezerskim potocima bile su pod utjecajem temperature u ljeto 2020. i koncentracije O₂ u zimi 2021. Rezultati su potvrđeni permutacijskom multivarijantnom analizom varijance (PERMANOVA) (Tablica 3).

Tablica 3. Rezultati PERMANOVA testa utjecaja okolišnih parametara na formiranje mikrobnih zajednica unutar slatkovodnog povezanog sustava Plitvičkih jezera.

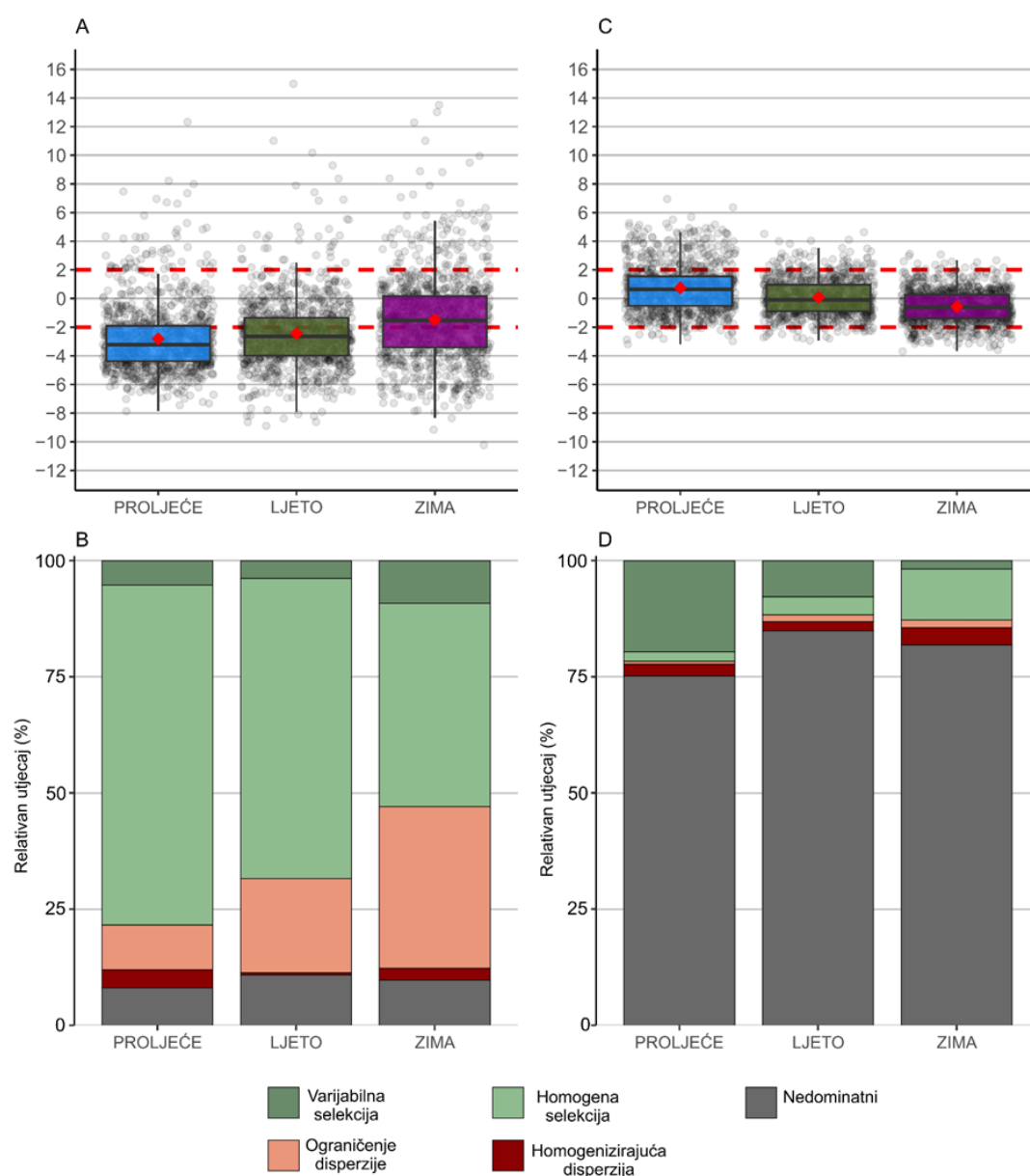
	PROLJEĆE		LJETO		ZIMA	
	r^2	p	r^2	p	r^2	p
	PROLJEĆE					
Temp.	-	-	0.99	0.032 *	0.97	0.011*
O₂	-	-	-	-	-	-
DOC	-	-	0.97	0.004 **	-	-
Ca²⁺	-	-	0.82	0.003 **	-	-
NO₃⁻	0.43	0.001 ***	0.34	0.001 ***	0.48	0.002 **
Količina padalina	-	-	-	-	-	-
Tip vodotoka	0.33	0.001 ***	0.35	0.001 ***	0.39	0.001 ***
Godina uzorkovanja	-	-	0.09	0.002 **	0.10	0.002 **
	GLJIVE					
Temp.	0.08	0.001 ***	0.09	0.001 ***	0.08	0.001 ***
O₂	0.05	0.003 **	0.09	0.001 ***	0.07	0.001 ***
DOC	-	-	0.06	0.003 **	0.08	0.001 ***
Ca²⁺	0.06	0.001 ***	0.06	0.003 **	0.05	0.008 **
NO₃⁻	-	-	0.04	0.034 *	0.06	0.004 **
Količina padalina	0.06	0.001 ***	0.09	0.001 ***	0.12	0.001 ***
Tip vodotoka	0.14	0.001 ***	0.11	0.001 ***	0.19	0.001 ***
Godina uzorkovanja	0.06	0.001 ***	0.09	0.001 ***	0.10	0.001 ***

4.1.5. Relativni utjecaj i kvantitativna analiza procesa sastavljanja mikrobnih zajednica između različitih godišnjih doba

Ekološki nulti model otkrio je β NTI ispod -2 u proljeće i ljeto, te na zimu u nekim slučajevima ispod -2, a drugima iznad, što sugerira da stohastički procesi utječu na strukturiranje prokariotske zajednice zimi (Slika 25A). Homogena selekcija u velikoj je mjeri pridonijela sastavljanju prokariotskih zajednica u svim godišnjim dobima (Slika 25B). Najveći doprinosi homogene selekcije utvrđeni su za prokariotske zajednice u proljeće. Ograničenja disperzije također su utjecala na okupljanje prokariotske zajednice u svim godišnjim dobima, s

najvećim utjecajem na prokariotske zajednice zimi. Varijabilna selekcija jače je utjecala na prokariotske zajednice zimi nego u proljeće i ljeto.

Ekološki nulti model za gljivičnu zajednicu otkrio je da je β NTI u rasponu od -2 do +2 od ovisno o sezoni, što sugerira da deterministički procesi imaju slabi utjecaj na strukturiranje zajednica gljiva (Slika 25C). Homogena selekcija pridonijela je okupljanju gljivičnih zajednica u proljeće, dok je varijabilna selekcija utjecala na zajednice gljiva zimi, ali većina procesa bila je nedominantni (Slika 52D).



Slika 25. Procesu okupljanja zajednice prokariota i gljiva. Okvirni dijagrami koji ilustriraju varijacije u β -najbližem taksonomskom indeksu (β NTI) za prokariotske zajednice (A) i

zajednice gljiva (C) iz različitih godišnjih doba. Postotak promjene u skupu zajednice prokariota (B) i gljiva (D) kroz različite sezone uzorkovanja.

4.1.6. Hidrokemijske i sezonski uvjetovane promjene mikrobnih zajednica u slatkovodnom povezanom ekosustavu

Okolišni parametri su u uzorcima iz međujezerskih potoka pokazali ukupnu ujednačenost, dok su uzorci iz pritoka bili više raspršeni. Sukladno tome, očekivane su razlike u mikrobnim zajednicama između različitih vrsta potoka, kao što je prethodno prikazano u sličnim povezanim ekosustavima [156,157]. Prokariotske i zajednice gljiva (Slika 23) pokazale su razlike u sastavu zajednica između pritoka i nizvodnih mjesta (međujezerski potoci i rijeka Korana). Analiza biogeografske razlike mikrobnih zajednica duž longitudinalnog gradijenta samo je daljnja potvrda različitih mikrobnih zajednica u pritokama i nizvodno (Slika 24). Doista, ispitivanjem najduljeg toka vode u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera, pokazalo je da se i bakterijske i zajednice gljiva razlikuju s povećanjem geografske udaljenosti [157]. Raznolikost mikrobnih zajednica već je bila vidljiva na višoj taksonomskoj razini koljena, tako su dominantne Proteobacteria i Bacteroidota u pritokama zamijenjene Actinobacteriota nizvodno povezanom sustavu [158]. Slično tome, dominacija Chytridiomycota bila je vidljiva nizvodno, što dokazuje da su potoci putevi raspršivanja kopnenih gljiva [159–161]. Kopnene gljive ulaze u pritoke i teku nizvodno.

Na temelju okolišnih parametara, proljetni uzorci razlikovali su se prema godini uzorkovanja, ali ne i prema vrsti potoka (Slika 19), dok je PCoA analiza pokazala da postoji razlika između mikrobnih zajednica prema vrsti potoka, a ne prema godini uzorkovanja (Slika 23). Prokariotske zajednice u proljeće su deterministički uvjetovane te uglavnom nastaju djelovanjem mase [15]. Naime, homogena selekcija utječe na sastavljanje zajednice kada su okolišni uvjeti relativno predvidljivi [162]. Kroz proljeća pritisak okolišnih promjena u parametrima je mali (Tablica 3), te prokariotske zajednice koje ulaze u plitke pritoke s okolnog kopna s protokom vode zbog snažnog učinka mase gube na brojnosti i raznolikosti [156,163] (Dodatna slika 5). Jedini abiotski čimbenik koji je utjecao na sastav bakterijske zajednice bile su povišene koncentracije NO_3^- u pritokama (Slika 23), koje dosežu više razine u krškim vodenim sustavima tijekom kišne sezone [164]. Iz tog razloga vjerojatno je da razvrstavanje vrsta i odabir okoline slabo utječu na formiranje bakterijske zajednice. Formiranje zajednice gljiva bilo je pod utjecajem stohastičkih procesa zbog nedominantne frakcije (Slika 25C i D).

Uzimajući u obzir količinu taksonomski nedefiniranih ASV-ova ovakav rezultat nije iznenađujući. Bez obzira na to, malim udjelom otkrivenih procesa dominirao je odabir varijabli, što uzrokuje visoku promjenu sastava s velikim varijacijama u okolišnim čimbenicima [162]. Stoga su zajednice gljiva bile više pogođene okolišnim promjenama u proljeće (Tablica 3), ali su još uvijek uglavnom oblikovane učinkom mase.

Očekivano, veće promjene u okolišnim parametrima, odnosno uvjetima, dogodile su se ljeti između relativno zaštićenih, šumovitih pritoka i donjeg toka sustava, koji su podložni većim sezonskim fluktuacijama (Slika 19). Pritoci su očito još uvijek bili pod jakim utjecajem okolnog tla, a učinak mase također je oblikovao cjelokupni sastav zajednice. Međutim, ovisno o uvjetima okoliša tijekom ljeta, utjecaji razvrstavanja vrsta i odabira okoline bili su jači, osobito u donjem toku [15]. Formiranje prokariotske zajednice i ovdje je deterministički uvjetovano, a kako su se okolišni parametri normalno mijenjali sezonski bez velikih skokova, tako je i sastav zajednice i dalje bio pod utjecajem homogene selekcije [162]. Formiranje zajednice gljiva je opet bilo pod velikim stohastičkim utjecajem zbog nedominantne frakcije (Slika 25D).

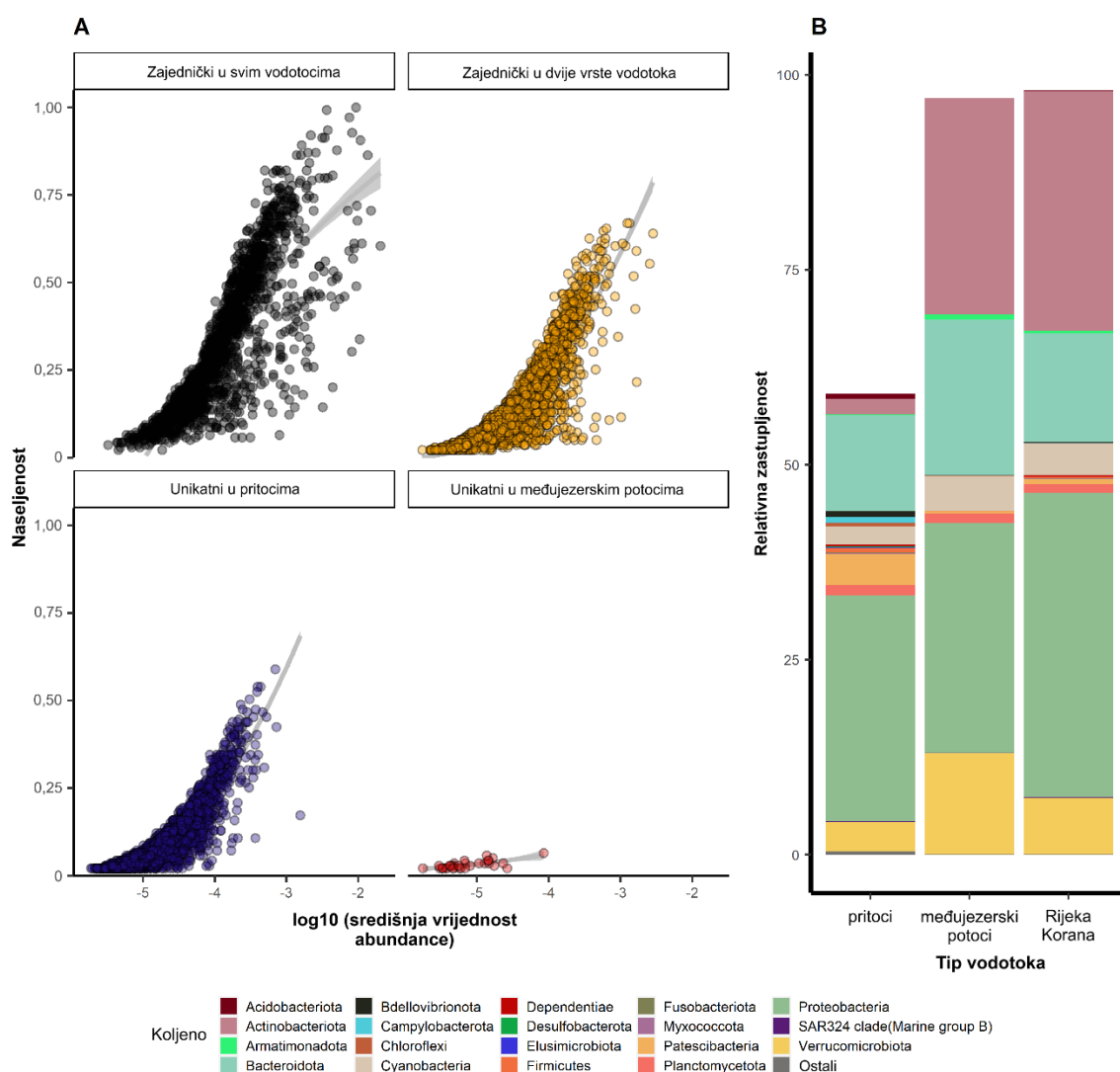
Zimi su uzorci iz međujezerskih potoka bili ujednačeni prema okolišnim parametrima, dok su uzorci iz pritoka bili raspršeni (Slika 19). Veliki utjecaj na pritoke bio je veliki skok koncentracije DOC-a, koja je 2021. godine bila povišena zbog snijega [50]. I ovdje je formiranje prokariotskih zajednica bilo deterministički uvjetovano, ipak ovdje je bio jači utjecaj stohastičkih procesa u odnosu na druga godišnja doba (Slika 25B). Zimi je kretanje mikroorganizama na novo mjesto ograničenije; stoga su pokazali jače ograničenje disperzije [18]. Slabiji utjecaj okolišnih parametara (Tablica 3) te razlike u alfa i beta raznolikosti potvrdili su veći utjecaj masa i veći stohastički utjecaj na formiranje prokariotskih zajednica. Zajednice gljiva ponovno su najvećim dijelom bile uvjetovane nedominantnom frakcijom, a od detektiranih procesa izdvajala se homogena selekcija (Slika 25D). Promjene u okolišnim parametrima nisu bile iznenađujuće pa su stoga zajednice formirane homogenom selekcijom, ali su parametri ipak utjecali na promjene zajednice (Tablica 3).

4.1.7. Temeljni središnji mikrobiom slatkovodnog povezanog ekosustava

Vennov dijagram korišten je kao jedna od analiza preklapanja između mikrobnih zajednica u različitim sezonama i pokazao je da unutar prokariotske zajednice (Dodatna slika 8A) i zajednice gljiva (Dodatna slika 8B) većina svojti bila jedinstvena za pritoke. Znatan broj ASV-ova dijelile su sve tri vrste potoka ili dva tipa potoka u svim godišnjim dobima. Manji broj

ASV-ova bio je jedinstven za međujezerske potoke, dok je rijeka Korana imala najviše 11 jedinstvenih ASV-ova.

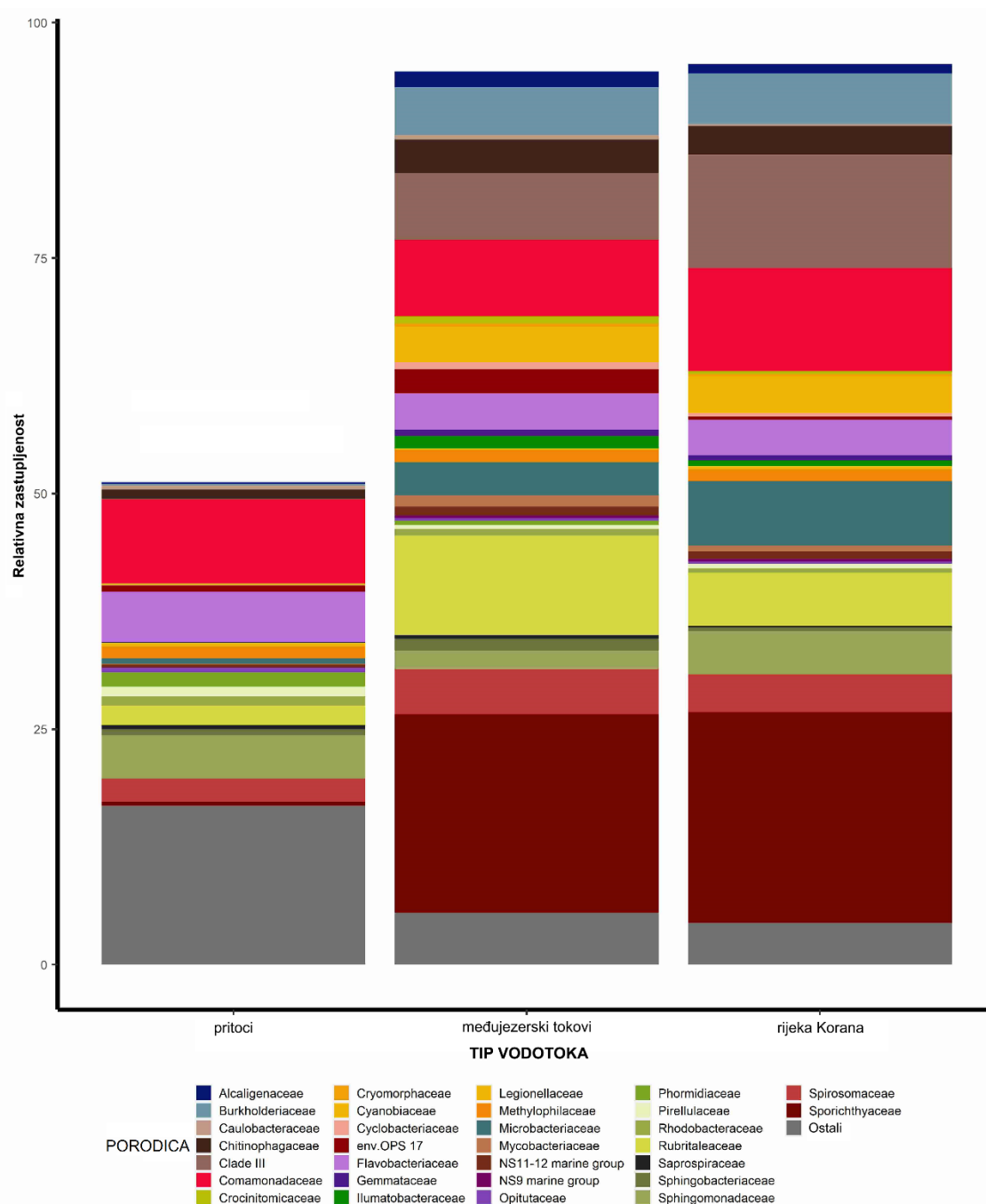
Odnos brojnosti i naseljenosti prokariotskih (Slika 26A) i gljivičnih (Slika 28A) zajednica pokazala je najveći broj ASV-ova zajedničkih za sve vrste potoka, a iako je većina ASV-ova bila jedinstvena za pritoke, bili su relativno rijetko prisutni. ASV-ovi zajednički u sva tri tipa potoka su bili relativno najzastupljeniji u svim uzorcima i definirani kao temeljni središnji mikrobiom ovog specifičnog slatkovodnog povezanog ekosustava. Temeljni središnji mikrobiom pokrivaio je 90% prokariotske zajednice međujezerskih potoka i rijeke Korane te 70% zajednice pritoka (Slika 26B).



Slika 26. Odnos obilja i naseljenosti korištene su za identifikaciju temeljnog središnjeg mikrobioma prokariotske zajednice slatkovodnog povezanog ekosustava (A). Relativna

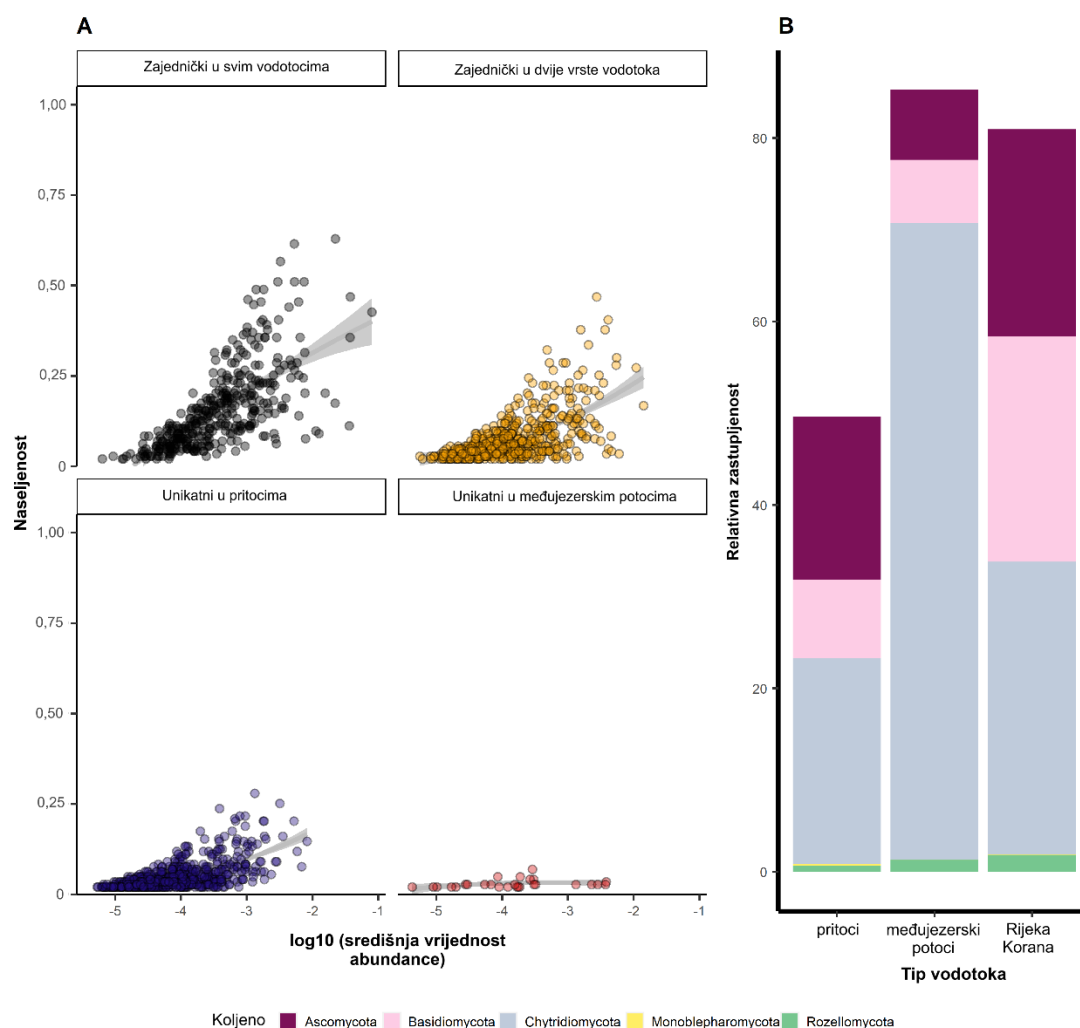
zastupljenost središnjeg mikrobioma, grupiranih prema vrsti toka i označenih bojama prema koljenu (B).

Najzastupljenije bakterije bile su iz koljena Proteobacteria, Bacteroidota i Actinobacteria (Slika 26B). Detaljnija analiza nižih taksonomskih razina središnjeg mikrobioma otkrila je 195 različitih prokariotskih porodica. Bakterije iz porodice Comamonadaceae dominirale su zajednicom u pritokama, a uz njih su bile prisutne u većoj relativnoj zastupljenosti bakterije iz porodica Flavobacteriaceae i Sphingomonadaceae (Slika 27). Nizvodno, odnosno u odnosno u međujezerskim potocima i rijeci Korani, dominirale su bakterije iz porodice Sporichthyaceae. Uz spomenute bakterije također su u većoj zastupljenosti bile prisutne bakterije iz porodica Clade III, Comamonadaceae, Microbacteriaceae i Rubritaleaceae (Slika 27).



Slika 27. Relativna zastupljenost središnjeg mikrobioma, grupiranih prema vrsti toka i označenih bojama prema porodici.

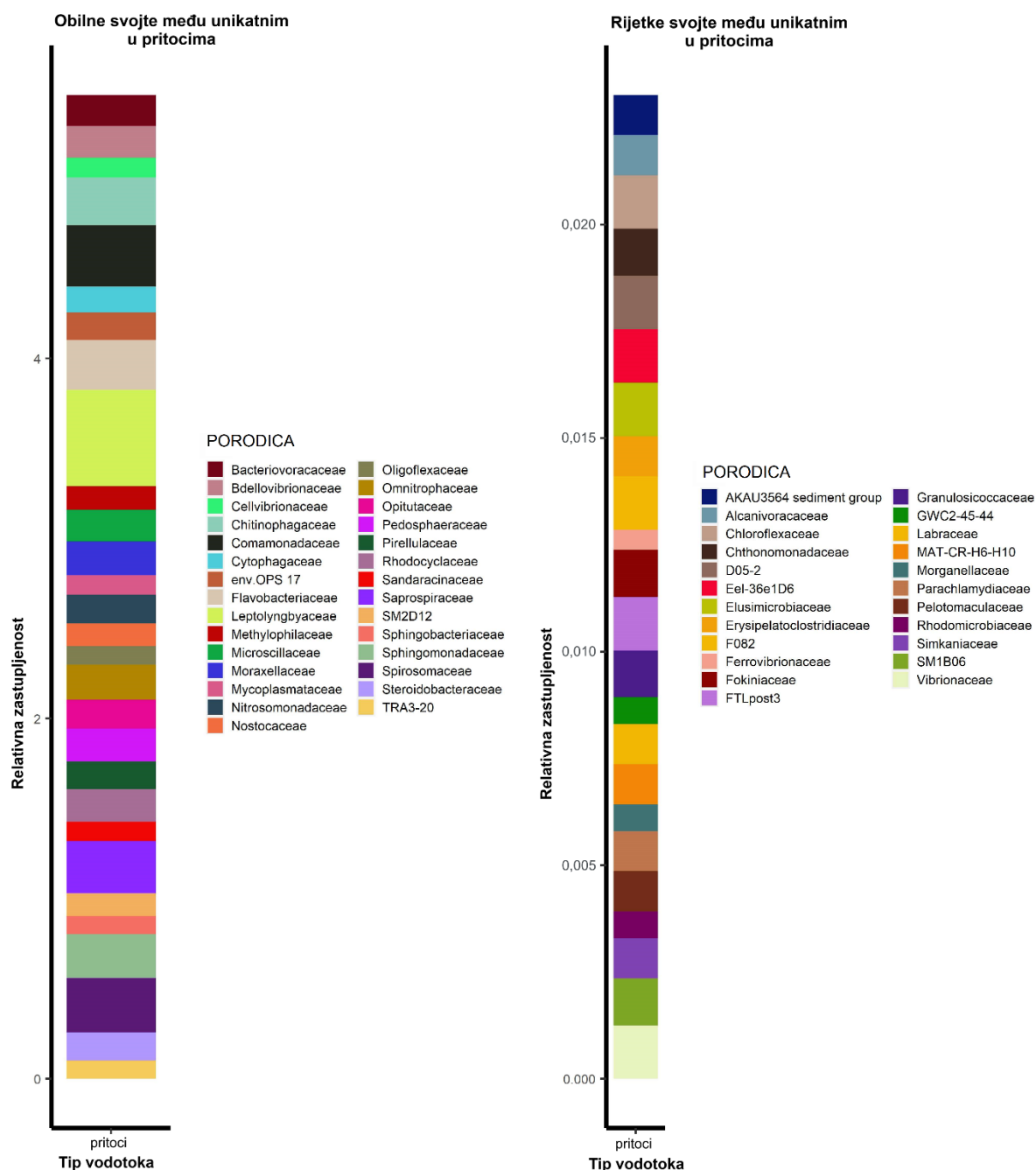
U zajednici gljiva, temeljni središnji mikrobiom činio je od 80% do 85% zajednica međujezerskih potoka i rijeke Korane, te oko 50% zajednica pritoka (Slika 28B). Temeljni središnji mikrobiom zajednice gljiva sastojao se od Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, Monoblepharomycota i Rozellomycota (Slika 28B).



Slika 28. Odnos obilja i naseljenosti korištene su za identifikaciju temeljnog središnjeg mikrobioma zajednice gljiva slatkovodnog povezanog ekosustava (A). Relativna zastupljenost središnjeg mikrobioma, grupiranih prema vrsti toka i označenih bojama prema koljenu (B).

Bakterije iz koljena Proteobacteria i Bacteroidota prevladavale su u prokariotskoj zajednici koja je bila jedinstvena za pritoke (Dodatna slika 9), a gljive Chytridiomycota u zajednicama gljiva (Dodatna slika 10). Kako bi se bolje identificirala jedinstvenost pritoka, istraženo je 30 najbrojnijih i najrjeđih porodica (Slika 29). Porodice Chitinophagaceae, Leptolyngbyaceae, Saprospiraceae i Spirosomaceae bile su najzastupljenije, dok su se Erysipelatoclostridiaceae, Pelotomaculaceae i Vibrionaceae isticala među rijetkim svojcima (Slika 29).

Iako manje brojni, ASV-i podijeljeni u dva tipa vodotoka u prokariotskim zajednicama bili su brojniji od jedinstvenih i činili su 25% prokariotskih (Dodatna slika 9) i gljivičnih zajednica pritoka (Dodatna slika 10), dok su u međujezerskim potocima i rijeci Korani činili manje od 5% prokariotskih (Dodatna slika 9) i manje od 20% gljivičnih zajednica (Dodatna slika 10).



Slika 29. Relativna zastupljenost 30 najzastupljenijih i najrjeđih porodica u prokariotskim zajednicama unikatnih u pritocima.

Sve u svemu, slatkovodni povezani ekosustav Plitvičkih jezera karakterizirale su relativno stabilne mikrobne zajednice s malim sezonskim promjenama zbog zajednica prisutnih u svim vrstama vodotoka, opisanih kao temeljni središnji mikrobiom. Iako je većina prokariotskih ASV-ova bila jedinstvena za pritoke, bili su rijetki i prisutni u manjoj relativnoj zastupljenosti (Slika 26A), a najznačajniji dio prokariotskih zajednica u pritokama bio je temeljni središnji mikrobiom, također prisutan u više od 90 % drugih tipova vodotoka (Slika 26B). Bakterije iz koljena Proteobacteria su bile najbrojnije u središnjem mikrobiomu, a već ranije su prepoznate kao prijelazni elementi u povezanom ekosustavu od potoka do jezera [165]. Koljenom Proteobacteria dominirale su kemotrofne Comamonadaceae, koje se obično nalaze u podzemnim i krškim vodama [166], prvenstveno zbog njihove uloge u iskorištavanju različitih izvora ugljika [167]. Od ostalih brojnijih bakterija bile su one iz koljena Bacteroidota i Verrucomicrobiota, koje, zajedno s Proteobacteria, predstavljaju najprofiliranija koljena u bakterijskim zajednicama slatkovodnih ekosustava [168]. Najbrojnije porodice unutar gore spomenutih koljena, Flavobacteriaceae (Bacteroidota) i Rubritaleaceae (Verrucomicrobiota), bile su bakterije koje su inače povezane s cvjetanjem fitoplanktona i razgradnjom polimerne tvari [169]. Flavobacteriaceae su bile zastupljenije u uzvodnim uzorcima jer su sposobne razgraditi svu organsku tvar prisutnu u okolišu i stoga su važne za procese biorazgradnje u okolišima podzemnog krša [170]. Bakterije iz koljena Actinobacteriota su već povezivane s krškim ekosustavima [171], pa ne čudi da su sveprisutne u ekosustavu Plitvičkih jezera. Iako su bile prisutne u maloj količini u pritokama, doživjele su nagli porast nizvodno, potvrđujući njihovu konkurentnost [172]. Bakterije iz najdominantnije porodice unutar koljena Actinobacteriota, Sporichthyaceae, posjeduju fototrofna svojstva i sposobne su preživjeti u oligotrofnim okruženjima [173]. To su fotoheterotrofne bakterije koje koriste biorazgradivi DOC kao izvor ugljika i proizvode vlastiti DOC u kombinaciji sa sunčevom energijom, zbog čega su dominirale u nizvodnim dijelovima ekosustava [173]. Neke neočekivane bakterije bile su prisutne u središnjem mikrobiomu, kao što su one iz koljena Patescibacteria, koje su izvorno pronađene u podzemnim vodama i vodonosnicima, staništima siromašnim hranjivim tvarima, gdje čine čak 20% mikrobne zajednice [174,175]. Njihova velika brojnost u pritokama nije iznenađujuća jer je poznato da mikrobne zajednice krškom vodom iz dubina dolaze na površinu [176]. Ipak, njihova prisutnost u jezerima ukazuje na njihovu konkurentnost i ekološku ulogu u okolišima bogatim kisikom [177].

Što se tiče temeljnog središnjeg mikrobioma zajednice gljiva, manji postotak bio je prisutan u svim vrstama potoka (Slika 28B) s dominacijom koljena Chytridiomycota, koja se obično nalazi u vodenim staništima [117,178] s različitim funkcijama od razgradnje otpada [179] do parazitizma algi, kada potencijalno induciraju staničnu smrt i poremećaj stanične stijenke za oslobađanje organske tvari kako bi se izravno razgradila [180]. Predstavnici koljena Ascomycota i Basidiomycota bili su prisutni u većim količinama u uzorcima pritoka i rijeke Korane, vjerojatno zbog sudjelovanja u simbiozi lišajeva [181]. Također, veća brojnost Ascomycota povezana je s njihovom važnom ulogom u sukcesiji ekosustava [182].

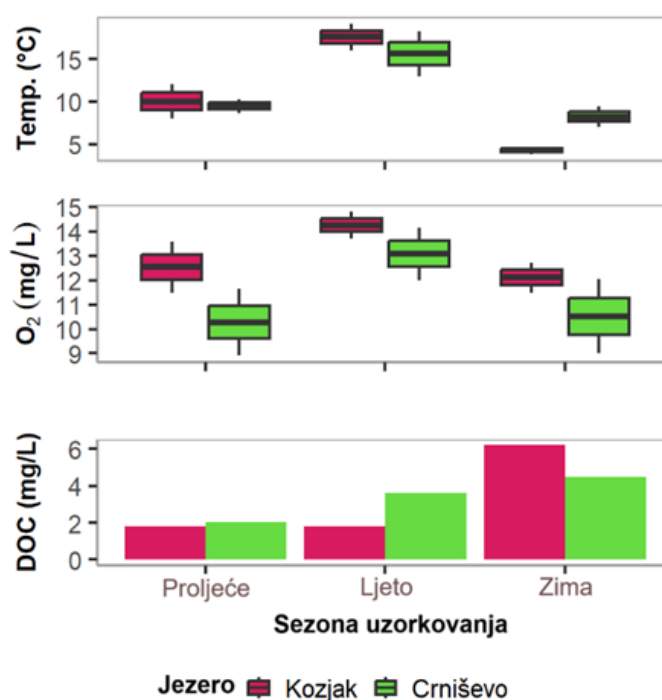
Dominaciju među bakterijama jedinstvenim za pritoke u zajednici predvodile su široko rasprostranjene bakterije šumskog tla iz porodica Chitinophagaceae i Saprospiraceae [183] te Leptolyngbyaceae, koje između ostalih funkcija imaju i funkciju fiksacije dušika [184]. Među rijetkim vrstama mogu se pronaći bakterije iz porodica povezanih s aromatskom razgradnjom, na primjer Pelotomaculaceae [185]. Vrste jedinstvene za pritoke te one podijeljene u dva tipa potoka, činile su veći dio zajednice gljiva (Slika 28A). Različite porodice, poput Mortierellomycota i Neocallimastigomycota, pokazale su veći utjecaj tla i sedimenta na pritoke [117], kao i Olpidiomycota, gljive koje su tipično unutarnji paraziti algi, rotifera i korijena biljaka [186].

4.2. Druga faza istraživanja

4.2.1. Okolišni parametri jezera Kozjak i Crniševo

Uzorci vode prikupljeni su u proljeće, ljeto 2022. i zimu 2023. iz dva prirodna krška jezera u Hrvatskoj, Kozjak i Crniševo, na 10 m dubine. Proljetni uzorci uzeti su između proljetnog i ljetnog cvjetanja fitoplanktona, ljetni tijekom ljetnog cvjetanja fitoplanktona, a zimski uzorci na kraju zime, prije proljetnog cvjetanja fitoplanktona.

Temperature vode u jezerima pokazivale su slične sezonske profile, s najvišim ljetnim temperaturama od 16 i 18 °C, a zimskim minimumom od 4 odnosno 8 °C u Kozjaku i Crniševu (Slika 30). Koncentracije O₂ pratile su isti trend i dosegle vrhunac preko 13 mg L⁻¹ na ljeto (Slika 30). Općenito, više koncentracije O₂ izmjerene su na Kozjaku nego na Crniševu. Koncentracije DOC-a dosegle su vrhunac zimi sa 6 mg L⁻¹ u Kozjaku i 4 mg L⁻¹ u Crniševu (Slika 30).



Slika 30. Okolišni parametri (temperatura, koncentracije O₂ i DOC) izmjereni u jezerima Kozjak i Crniševo. Različite boje predstavljaju jezera.

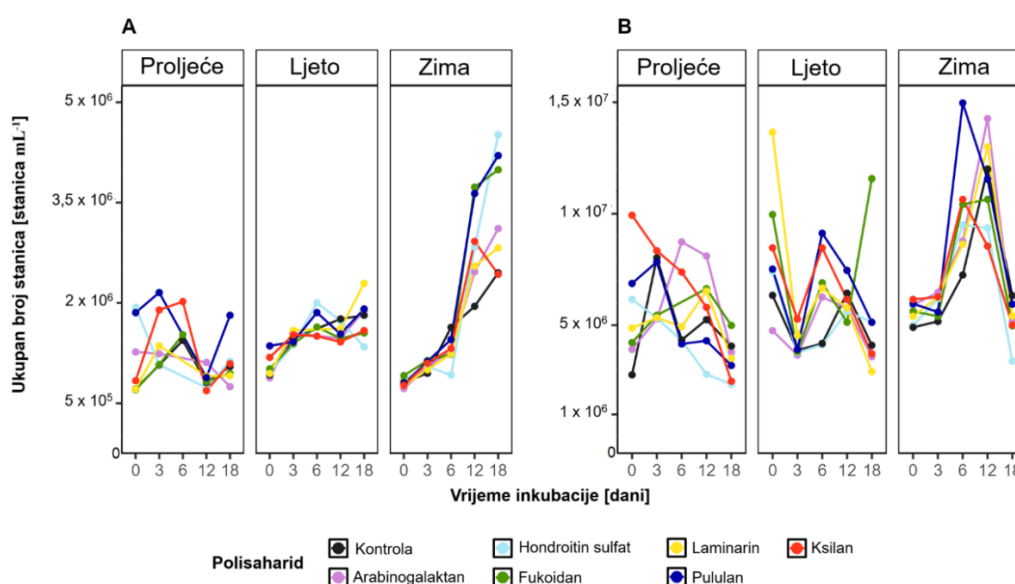
pH vrijednosti bile su relativno stabilne kroz godišnja doba, dok su vodljivost, salinitet i koncentracije izmjerenih aniona (Cl⁻, SO₄²⁻) i Na⁺ bili mnogo viši u Crniševu i vrhunac su imali

ljeti (Dodatna tablica 4). U Kozjaku su izmjerene više koncentracije Ca^{2+} osobito u proljeće i zimi, dok su u Crniševu najviše koncentracije Ca^{2+} bile u proljeće. Koncentracije Mg^{2+} i NO_3^- bile su slične u oba jezera (Dodatna tablica 4).

4.2.2. Fluktuacije ukupnog broja stanica u inkubacijama kroz različite sezone i jezera

Ukupni broj stanica iz inkubacija određen je na temelju brojanja signala boje nukleinske kiseline (DAPI) (Dodatna slika 11), nakon isključivanja bakterija iz koljena Cyanobacteria (Dodatna slika 2).

Ukupan broj stanica u Kozjaku u prosjeku je iznosio od $1,4 \times 10^6$ stanica mL^{-1} kroz sva tri godišnja doba, dostigavši vrhunac tijekom zimskih inkubacija do $4,5 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (Slika 31A). U Kozjaku tijekom ljetnih inkubacija, nakon najviših vrijednosti dosegnutih na 3. i 6. dan, broj stanica u svim inkubacijama je pao i stabilizirao se na sličnim vrijednostima (prosječno $1,7 \times 10^6$ stanica mL^{-1}). U zimskim inkubacijama došlo je do sličnog povećanja broja stanica između 6. i 12. dana (do $3,7 \times 10^6$ stanica mL^{-1}), a dogodilo se u svim inkubacijama te kontrolnoj inkubaciji (Slika 31A). Nakon 12. dana, broj stanica se povećao (do $4,5 \times 10^6$ stanica mL^{-1}) u svim inkubacijama osim u ksilanu, gdje je broj stanica pao.

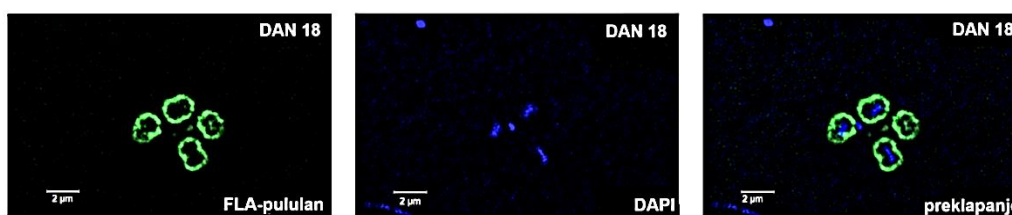


Slika 31. Fluktuacije ukupnog broja stanica tijekom vremena inkubacije u kontrolnim uzorcima i s dodanim polisaharidima u različitim sezonama uzorkovanja na Kozjaku (A) i Crniševu (B) Različite boje predstavljaju dodane polisaharide, a kontrolni uzorak je obojen crno.

U Crniševu je izbrojan veći početni broj stanica u prosjeku $6,3 \times 10^6$ stanica mL^{-1} , sa značajnom varijabilnošću i fluktuirajućim obrascima kroz sva godišnja doba i vremenski period inkubacija (Slika 31B). U Crniševu tijekom proljetnih inkubacija postojala je velika varijabilnost u početnom broju stanica između različitih inkubacija ($2,8 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (kontrola), $3,9 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (arabinogalaktan) i $9,9 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (ksilan), Slika 31B). Brojevi su varirali kroz cijeli period inkubacija, ali su pokazali opće smanjenje (u rasponu $2,4 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ stanica mL^{-1}). Ljeti je postojala velika varijabilnost u početnom broju stanica slično kao u proljeće ($1,4 \times 10^7$ stanica mL^{-1} (laminarin) i $4,8 \times 10^6$ stanica mL^{-1} (arabinogalaktan) te su brojevi opali do 3. dana, zatim rasli do 6. dana, posebno u inkubacijama pululana i ksilana, prije nego što su se snizili do 18. dana, osim u fukoidanu. Usporedno, zimske inkubacije pokazale su sličnu početnu brojnost stanica u svim inkubacijama (prosječno $6,3 \times 10^6$ stanica mL^{-1}). Nakon toga, sve inkubacije pokazale su povećanje broja stanica do 6. ili 12. dana (prosječno $6,4 \times 10^6$ stanica mL^{-1}), nakon čega su se značajno smanjili (prosječno $6,3 \times 10^6$ stanica mL^{-1}).

4.2.3. Fluktuacije udjela razgradnje polisaharida sebičnim mehanizmom

Udio bakterijske zajednice koja pokazuje sebični unos kvantificiran je brojem stanica koje pokazuju unos FLAPS-a tijekom inkubacija (Slika 32).



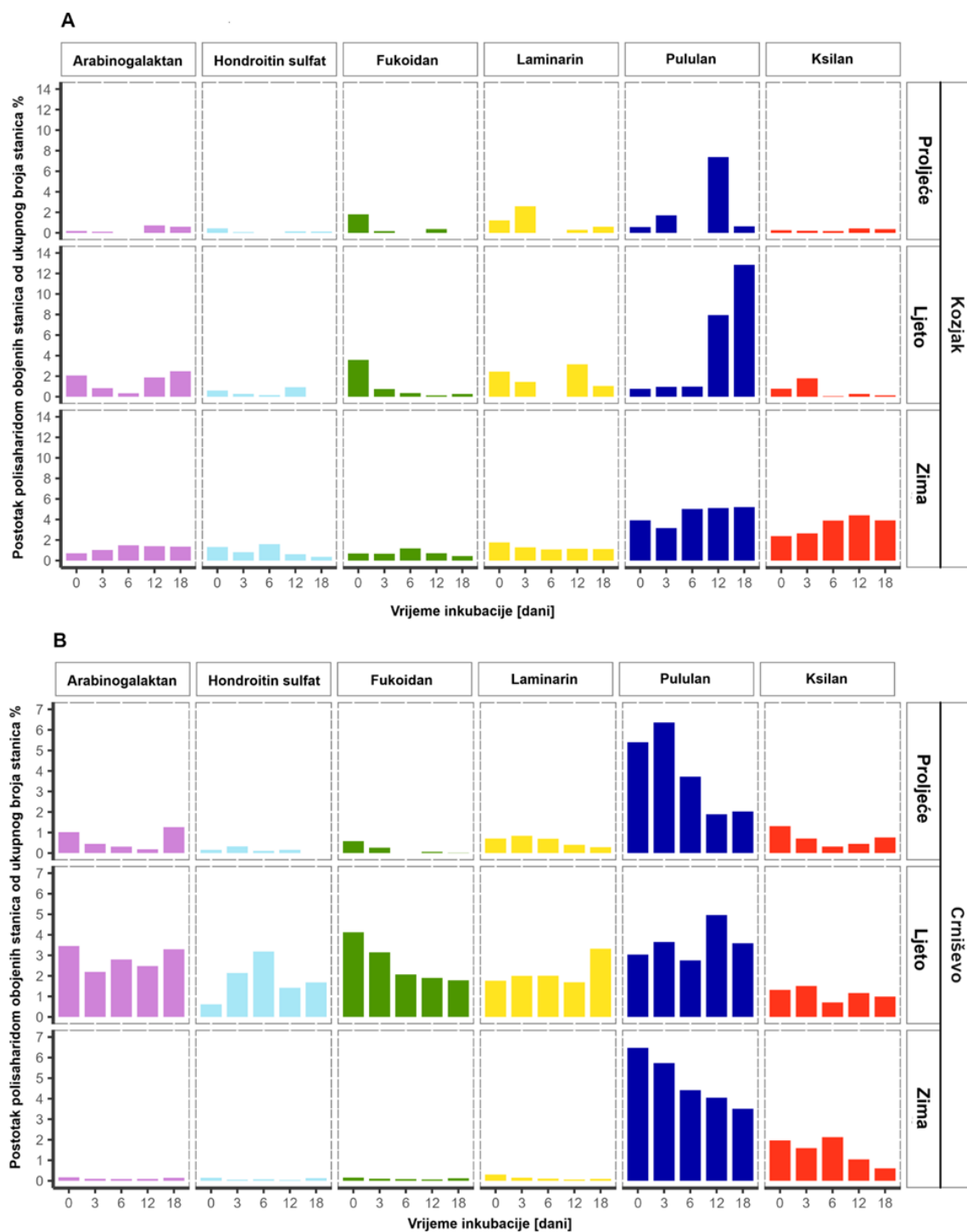
Slika 32. Slike super-rezolucijskog oslikavanja stanica obojenih FLA-pululanom, DAPI-ijem za nukleinsku kiselinu i preklapanje oba signala u jezeru Kozjak tijekom ljetne inkubacije 18. dana.

Sebično aktivne bakterije otkrivene su u oba jezera tijekom svih razdoblja uzorkovanja (Slika 33). U oba jezera, udio zajednice koja je pokazala razgradnju FLAPS-a sebičnim mehanizmom bio je najveći za pululan, posebno s maksimumom u jezeru Kozjak tijekom ljeta,

do 12% (Slika 33A), i u Crniševu tijekom zime, do 7% (Slika 33B). Druga najveća aktivnost razgradnje sebičnim mehanizmom bila je za ksilan unutar oba jezera, s do 5% obojenih stanica zimi u Kozjaku odnosno ljeti u Crniševu (Slika 33).

U Kozjaku, sebična aktivnost bila je promjenjiva tijekom proljeća i ljeta (Slika 33A). U proljeće su fukoidan i laminarin sebično uzimani tijekom prva 3 dana inkubacija (više od 1%), te je aktivnost zabilježena i pred kraj inkubacija (Slika 33A). Arabinogalaktan, hondroitin sulfat i ksilan također su sebično razgrađivani, ali u vrlo niskim postocima, dok je pululan najviše uzet 12. dan (10%). U ljetnim inkubacijama više sebične aktivnosti (2-4%) zabilježene su za arabinogalaktan, fukoidan, laminarin i ksilan, a za hondroitin sulfat aktivnost je bila vrlo niska (Slika 33A). Pululan je u početnim danima inkubacije uziman u nižim postocima, a pred kraj u mnogo većim postocima (Slika 33A). U zimskim uvjetima, zabilježena je konstanta sebična aktivnost bakterija za polisaharide arabinogalaktan, hondroitin sulfat, fukoidan i laminarin, ali u niskom postotku (oko 1%; Slika 33A). Usporedno, u Crniševu sebična aktivnost bila je dosljedna u proljeće i zimu, pri čemu su najveću razgradnju sebičnim mehanizmom imali pululan i ksilan u obje sezone (Slika 33B). U proljeće, više sebične aktivnosti zabilježene su za arabinogalaktan, laminarin i ksilan (do 1%), a sebična razgradnja pululana dosegla je 7% u prvim danima inkubacije (Slika 33B). U Crniševu je najveća razgradnja sebičnim mehanizmom zabilježena na ljeto, kada su svi polisaharidi bili razgrađeni u višim postocima u usporedbi s ostalim sezonama (Slika 33B). Postotci razgradnje bili dosežali su slične vrijednosti, između 3 i 5% (Slika 33B). U zimskim uvjetima, sebična aktivnost za pululan i ksilan bile su visoke, dok su za ostale polisaharide bile manje od 1% (Slika 33B). Sebična razgradnja pululana bila je najviša 0. dan inkubacije, a s vremenom je opadala (Slika 33B).

Zanimljivo je da je tijekom zime u Kozjaku i ljeta u Crniševu sebična aktivnost svih supstrata bila vrlo konzistentna tijekom 18 dana, što dosad nije viđeno u inkubacijama s FLAPS-evima [187].



Slika 33. Udio mikrobne zajednice koja koristi sebični mehanizam za razgradnju FLAPS-eva u jezerima Kozjak (A) i Crniševno (B) u različitim sezonama uzorkovanja.

4.2.4. *Prostorno-vremenske promjene razgradnje autohtonih i alohtonih polisaharida sebičnim mehanizmom*

Udio bakterijske zajednice koja pokazuje sebični unos kvantificiran je brojem stanica koje pokazuju unos FLAPS-a tijekom inkubacija (Slika 33). Trofičko stanje jezera utječe na aktivnost mikrobnih enzima [188] budući da razgradnja komponenti DOM-a čini hranjive tvari dostupnima u okolišu [90,91]. DOM u oligotrofnim i mezotrofnim jezerima može imati različito podrijetlo i sastav, stoga njihove mikrobne zajednice imaju različite enzimske sposobnosti. Ove različite sposobnosti odražavaju se u razgradnji šest različitih polisaharida sebičnim mehanizmom od strane bakterija. Najveća sebična aktivnost uočena je u oligotrofnom jezeru zimi i u mezotrofnom jezeru ljeti (Slika 33).

Oligotrofno jezero Kozjak [189], kroz godišnja doba ima niske koncentracije DOC-a i time nižu primarnu proizvodnju [190], te je pod utjecajem kontinentalne klime i karakterizirano je DOM-om bogatim ugljikom koji ulazi u jezero ispiranjem tla [50] iz okolne crnogorične vegetacije [191]. Nagli porast koncentracija DOC-a (Slika 30) i nitrata (Dodatna tablica 4) zimi dokazuje veliki unos alohtonog DOM-a [138]. Povećana sebična aktivnost očekivala se u oligotrofnom okruženju, a ne tijekom uvjeta više koncentracije DOC-a, budući da su prethodna istraživanja mora pokazala visoku sebičnu aktivnost u oligotrofnim morskim vrtlozima [13] i u dubokom moru [10,192]. Međutim, tijekom otjecanja tla kompleksni DOM ulazi u jezera izazivajući brzu reakciju sebičnih bakterija. Rezultati su pokazali visoku sebičnu aktivnost zimi što ukazuje na povezanost s vrlo ranom fazom proljetnog cvata, kada sebične bakterije postaju aktivne zbog izloženosti kompleksnom DOM-u [12]. Veći alohtoni utjecaj uzrokuje veću sebičnu aktivnost bakterija za ksilanom, složenog strukturnog polisaharida koji se nalazi u stanicama kopnenih biljaka [193]. Takva sebična aktivnost je već primijećena u sjevernom Jadranu [89], mjesto gdje je uočen veći utjecaj tla.

Slično, otkrivena je veća sebična aktivnost u mezotrofnom jezeru Crniševo tijekom ljeta (Slika 31B). Blaga zima uzrokuje višu stabilnu temperaturu tijekom godine (Slika 30) i više koncentracije hranjivih tvari (Dodatna tablica 4) što ukazuje na mezotrofno stanje jezera [189]. Mezotrofna jezera karakteriziraju više trofičko stanje i povećanu mikrobnu raznolikost te više koncentracije polisaharida, popraćene povišenim vanjskim enzimskim aktivnostima [14]. Visoke koncentracije DOC-a i ljeti i zimi ukazuju na utjecaj autohtonog i alohtonog DOM-a. Međutim, veće razlike u koncentracijama O₂, s najvišim vrijednostima ljeti (Slika 28), ukazuju na povećanu biotičku aktivnost, posebice fotosintezu fitoplanktona [190] i veći utjecaj

autohtonog DOM-a [138]. Usred ljetnog cvjetanja fitoplanktona, DOM širokog spektra prisutan je u velikim količinama [12] što potiče veću sebičnu aktivnost. Ovdje dotok morske vode kroz porozni krš [138] također može utjecati na mikrobne zajednice i sebičnu aktivnosti, kao što se vidi u višoj sebičnoj aktivnosti za fukoidan i laminarin (Slika 33B), koje proizvode fitoplankton i makroalge kao skladišne ili strukturne polisaharide [194]. Visoke stope vanjske hidrolize za oba polisaharida prethodno su pronađene u oligotrofnim jezerima [14], a za laminarin je uočen visoka razgradnja sebičnim mehanizmom u morskom okolišu [8,10–12,86]. Stoga se očekivala veća sebična aktivnost za te polisaharide, no moguće je da su bakterije u jezerima prilagođene njihovom korištenju drugim mehanizmima. Buduća istraživanja iskorištavanja polisaharida drugim mehanizmima neophodna su za potpuno sveobuhvatno razumijevanje bakterijske razgradnje polisaharida u slatkovodnim ekosustavima.

Najveća sebična aktivnost u oba jezera primijećena je za pululan, koji je bio slabo sebično razgrađen u površinskom morskom okolišu [10,12], a nije bio ni razgrađen vanjskom hidrolizom u oligotrofnim, već samo u eutrofnim jezerima [14]. Pululan je jednostavan polisaharid koji proizvode gljive kao izvanstanični agens za oblaganje [195] koji se nalazi u različitim okolišima, uključujući slatkovodne vode, šumsko tlo i površine lišća biljaka [196]. Stoga je očekivano da se pululan sebično razgrađuje u jezerima s velikim unosom alohtonog DOM-a (Slika 33), kao i u dubokim oceanima [10] gdje su gljive dominantna frakcija batipelagičnih čestica morskog snijega [197], te u okolišima pod utjecajem kopna, poput sjevernog Jadrana, koji je pod jakim utjecajem okolnih rijeka [89].

4.2.5. *Sastav mikrobnih zajednica u jezerima Kozjak i Crniševu*

Brojnost vrsta bila je veća u Crniševu, ali je bila usporediva s Kozjakom. Iznimka je brojnost tijekom ljeta i zime kada je bila znatno niža u Kozjaku (Tablica 4). Brojnost je bila najmanja ljeti u oba jezera, a najveća u proljeće u Kozjaku i zimi u Crniševu (Tablica 4).

Alfa raznolikost prema Shannon indeksu oba jezera bila je najmanja ljeti u oba jezera, a najveća na proljeće u Kozjaku i zimi u Crniševu (Tablica 4).

Tablica 4. Alfa raznolikost mikrobnih zajednica u jezerima Kozjak i Crniševo određenih kao brojnost i raznolikost prema Shannon indeksu.

Sezona uzorkovanja	Jezero	Brojnost	Shannon	Jezero	Brojnost	Shannon
Proljeće	Kozjak	181	3,93	Crniševo	189	3,71
Ljeto	Kozjak	146	3,30	Crniševo	178	3,28
Zima	Kozjak	145	3,37	Crniševo	177	3,76

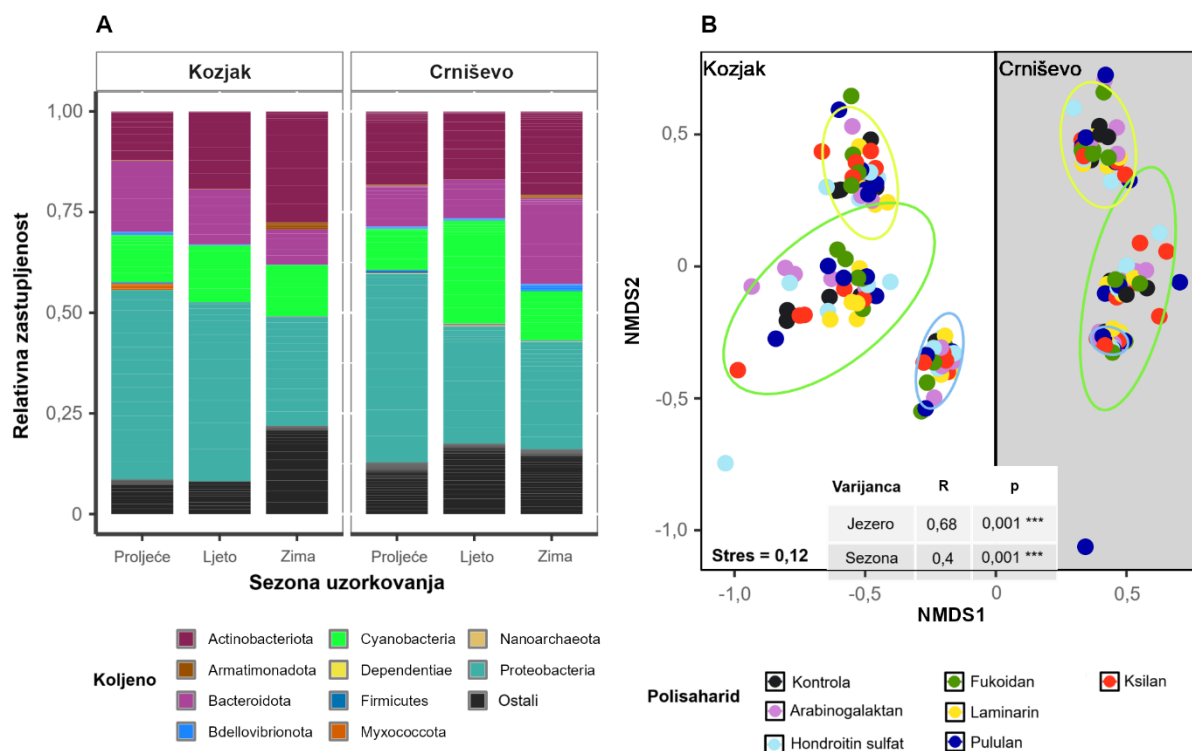
Okolišni parametri imali su značajan utjecaj na formiranje mikrobnih zajednica. Tako su promjene temperature i koncentracije O_2 značajno utjecali na sastav mikrobnih zajednica ljeti u oba jezera, dok su DOC i Ca^{2+} imali značajan utjecaj na zajednice u Crniševu zimi (Dodatna slika 12). Salinitet, Cl^- i SO_4^{2-} značajno su utjecali na zajednice u Crniševu ljeti, a NO_3^- na proljetnu zajednicu u Kozjaku (Dodatna slika 12).

U početnim mikrobnim zajednicama u oba jezera dominirale su Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria i Proteobacteria, s manjim sezonskim promjenama (Slika 34A). U Kozjaku na ljeti su Actinobacteriota i Proteobacteria dominirale, Bacteroidota u proljeće, a Actinobacteriota i rijetke svojte ($< 1\%$ relativne brojnosti) na zimu.

U Crniševu, Proteobacteria su dominirale proljetnom zajednicom (Slika 34A), Cyanobacteria na ljeto, a Bacteroidota su zimi dominirale s Actinobacteriota i Proteobacteria.

Za sve daljnje analize isključene su arheje i autotrofne cijanobakterije, budući da je unos FLAPS-a ispitivan samo u heterotrofnim bakterijskim zajednicama. Arheje su filtrirane zbog potencijalnih pristranosti upotrijebljenog para početnica za PCR amplifikaciju, što bi moglo utjecati na otkrivanje specifičnih arheja [115].

Sastav bakterijske zajednice značajno se razlikovao između uzorkovanih jezera (Slika 34B; ANOSIM: $R = 0,68$, $p = 0,001$). Unutar svakog jezera postojala je značajna razlika u bakterijskoj zajednici kroz svaku sezonu (Kozjak: ANOSIM: $R = 0,77$, $p = 0,001$; Crniševo: ANOSIM: $R = 0,90$, $p = 0,001$; Slika 34B). Vremenski period inkubacije imao je značajan, ali slab utjecaj na sastav bakterijskih zajednica u jezerima (Kozjak: ANOSIM: $R = 0,13$, $p = 0,001$; Crniševo: ANOSIM: $R = 0,04$, $p = 0,03$). Vrsta dodanog polisaharida u inkubacijama nije značajno utjecao na sastav bakterijske zajednice (Kozjak: ANOSIM: $R = -0,02$, $p = 0,82$; Crniševo: ANOSIM: $R = -0,03$, $p = 0,97$).



Slika 34. Prosječna relativna zastupljenost ukupne strukture mikrobne zajednice (razina koljeno) u inkubacijama s dodanim FLAPS-em na 0. dan kroz sezone uzorkovanja. Uzorci su podijeljeni po jezeru. Skupina "Ostalo" sadrži koljena s relativnom zastupljenošću manjom od 1% (A). NMDS ordinacija koja pokazuje Bray-Curtisovu različitost u sastavu mikrobne zajednice preko jezera (Kozjak i Crniševo). Zajednice u jezerima grupiraju se prema sezonama uzorkovanja koje su povezane elipsama označenim bojama (zeleno-proljeće, žuto-ljeto i plava zima). ANOSIM test značajnosti sastava mikrobnih zajednica temeljen na Bray-Curtisovim razlikama relativnih abundaca.

4.2.6. Odgovor bakterijskih zajednica na dodan FLAPS u inkubacije

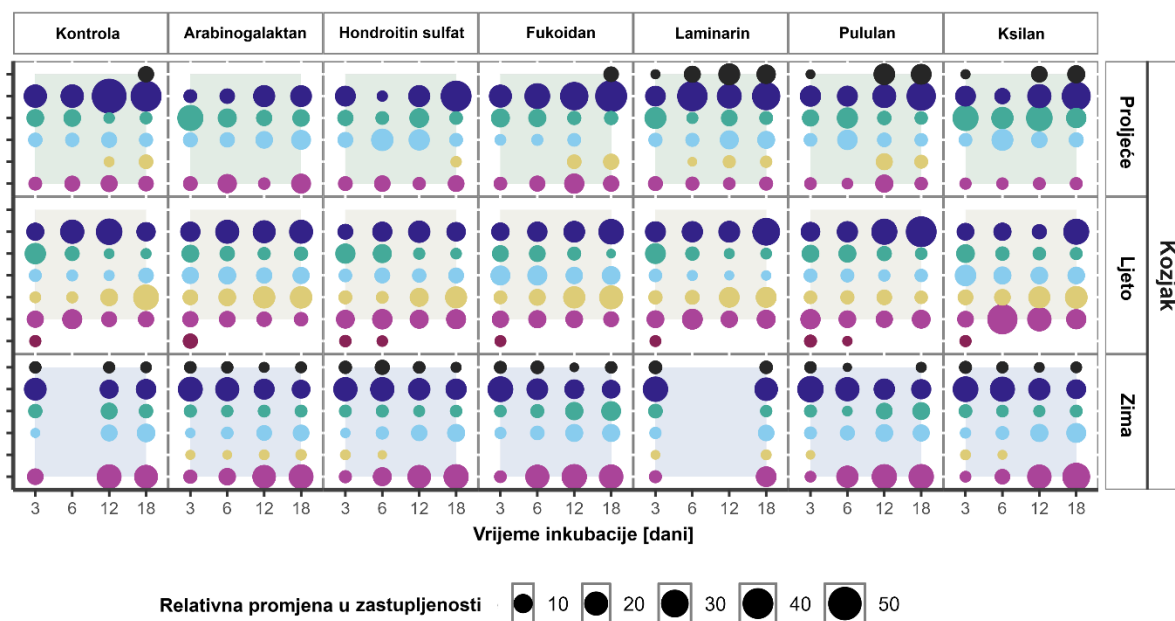
Promjene relativnih zastupljenosti bakterija kroz inkubacije analizirane su u postotku promjene zastupljenosti. Analiza je otkrila bakterije koje pokazuju pozitivan odgovor (povećanje relativne zastupljenosti u usporedbi s T0) na specifične polisaharide (Slika 35 i 36).

U Kozjaku su Planctomycetota pojavile kasnije u određenim inkubacijama (hondroitin sulfat, fukoidan, laminarin i pululan), dok je ljeti njihova relativna zastupljenost porasla u svim inkubacijama kroz vremenski period inkubacije; zimi su bili rano prisutni u nekim (hondroitin

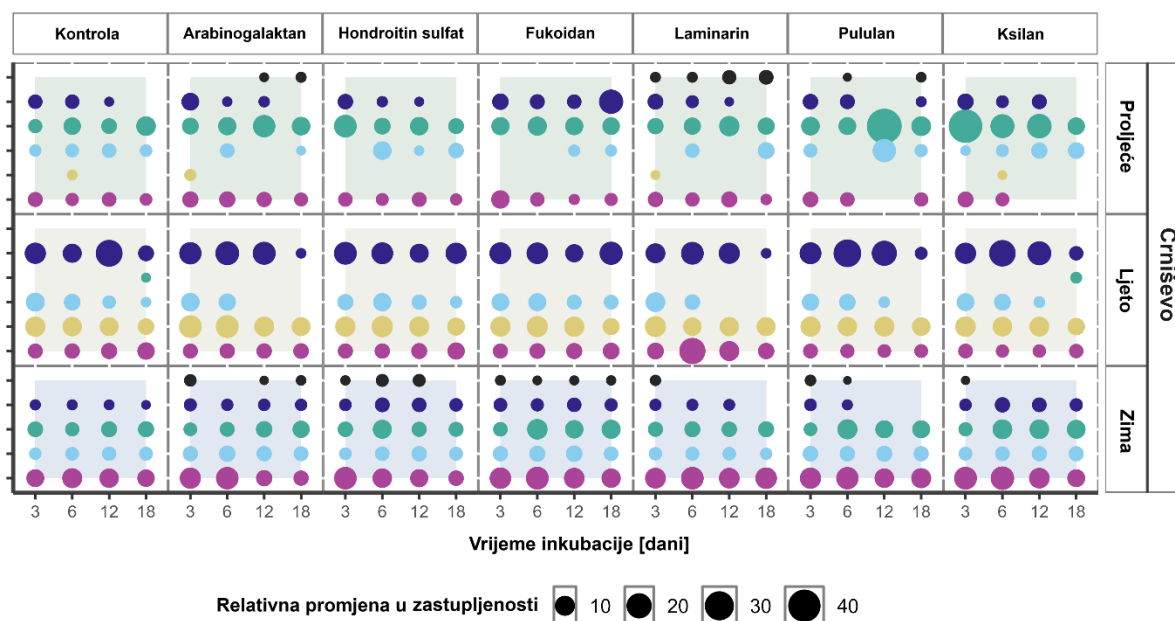
sulfat, pululan i ksilan) i dosljedno u drugim inkubacijama (arabinogalaktan i laminarin; Slika 35A). Relativna abundanca bakterija iz koljena Verrucomicrobiota povećavala se kroz vremenski period inkubacije tijekom proljeća i ljeta, dok je zimi njihova zastupljenost opadala jer su bakterije iz koljena Bacteroidota bile zastupljenije i povećavale se tijekom vremenskog perioda inkubacija (Slika 35A). Gammaproteobacteria su pokazale nešto veću relativnu zastupljenost u inkubacijama arabinogalaktana i ksilana tijekom proljeća, ali su inače bile prisutne tijekom svih inkubacija zajedno s Alphaproteobacteria (Slika 35A).

U Crniševu bakterije iz koljena Planctomycetota su bile vrlo zastupljene tijekom ljeta, odsutne tijekom zime i prisutne samo na početku triju proljetnih inkubacija (arabinogalaktan, laminarin i ksilan; Slika 35B). Bakterije iz koljena Verucomicrobiota su bile vrlo zastupljene u ljetnim inkubacijama s općim smanjenjem tijekom inkubacijskog perioda i imale malu relativnu zastupljenost tijekom zime i proljeća (Slika 35B). Povećanje relativne zastupljenosti bakterija iz koljena Verrucomicrobiota dogodilo se tijekom proljetne inkubacije fukoidana, dok su Bacteroidota imale smanjenje zastupljenosti (Slika 35B). Bakterije iz koljena Bacteroidota inače su imale nisku zastupljenost tijekom proljeća i djelomično tijekom ljeta, ali su bile vrlo zastupljene tijekom zime (Slika 35B). Bakterije iz koljena Gamaproteobacteria su dominirale zajednicama u inkubacijama pululana i ksilana tijekom proljeća i bile su najzastupljenija zajednica zajedno s Alphaproteobacteria u drugim inkubacijama. Ljeti su bile prisutne samo Alphaproteobacteria, dok su zimi obje bile prisutne sa sličnim zastupljenostima (Slika 35B).

A



B



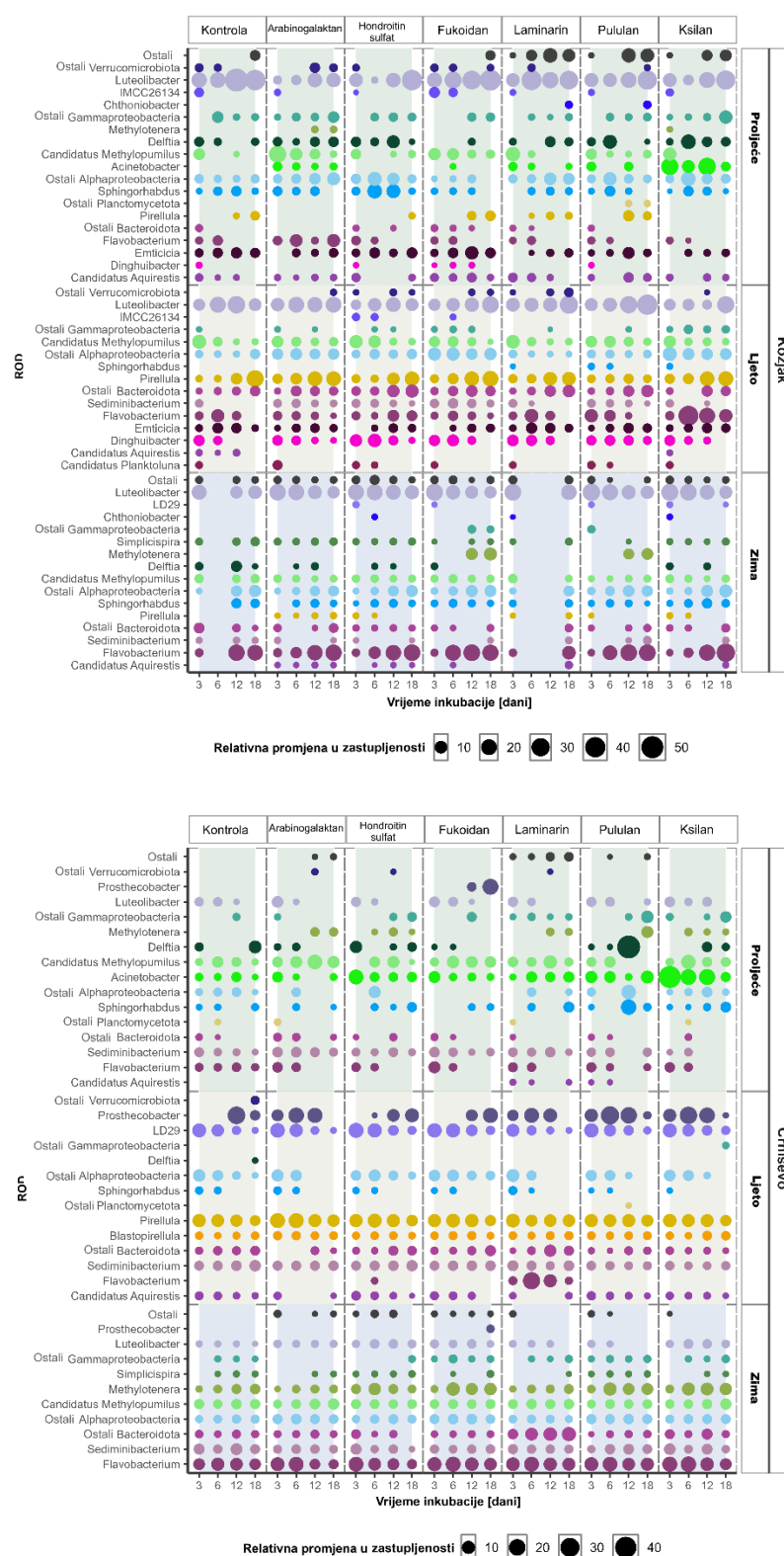
BAKTERIJA

- ACTINOBACTERIOTA
- PLANCTOMYCETOTA
- GAMMAPROTEOBACTERIA
- OSTALI
- BACTEROIDOTA
- ALPHAPROTEOBACTERIA
- VERRUCOMICROBIOTA

Slika 35. Postotna promjena relativne zastupljenosti bakterijske zajednice usporedbi s početnom T0 zajednicom kroz vrijeme inkubacije u jezerima Kozjak (A) i Crniševno (B) podijeljeno po sezoni i dodanom polisaharidima. Svoje su obojene prema razini koljena i razreda.

U Kozjaku rod *Pirellula* dominirao je zajednicom Planctomycetota, a rod *Luteolibacter* zajednicom Verrucomicrobiota u svim godišnjim dobima. (Slika 36A). Rodovi *Dinghuibacter* i *Sediminibacterium* bili su vrlo zastupljeni tijekom ljeta, a odsutni ili slabo zastupljeni tijekom proljeća i zime kada su dominirali rodovi *Emticicia* odnosno *Flavobacterium*. Rod *Candidatus Methylopumilus* je bio zastupljen u svim godišnjim dobima, dok je rod *Acinetobacter* bio prisutan samo u proljeće, a rod *Simplicispira* zimi. Rod *Delftia* je bio odsutan samo tijekom ljeta kao i rod *Sphingorhabdus* (Slika 36A).

U Crniševu zajednicom Planctomycetota dominirali su rodovi *Pirellula* i *Blastopirellula* (Slika 36B). Ljeti je dominacija u zajednici Verrucomicrobiota podijeljena između rodova *Prostheco bacter* i *LD29*, koji su bile prisutni samo tijekom ove sezone. U ostalim godišnjim dobima rod *Luteolibacter* je dominirao. Rod *Prostheco bacter* se pojavio tek na kraju inkubacije fukoidana u proljeće i zimi. Rodovi *Flavobacterium* i *Sediminibacterium* dominirali zajednicom Bacteroidota u zimskim inkubacijama. Dok je rod *Sediminibacterium* bio prisutan u ostalim godišnjim dobima, rod *Flavobacterium* je pronađen samo na početku proljetnih inkubacija i u laminarin inkubaciji tijekom ljeta. Rod *Candidatus Aquirestis* je bio prisutan samo tijekom ljeta. Rod *Candidatus Methylopumilus* bio je prisutan i tijekom proljeća i ljeta, a rod *Sphingorhabdus* tijekom proljeća i ljeta (Slika 36B).



Slika 36. Postotna promjena relativne zastupljenosti bakterijske zajednice usporedbi s početnom T0 zajednicom kroz vrijeme inkubacije u jezerima Kozjak (A) i Crniševno (B) podijeljeno po sezoni i dodanom polisaharidima. Svojte su obojene prema razini roda.

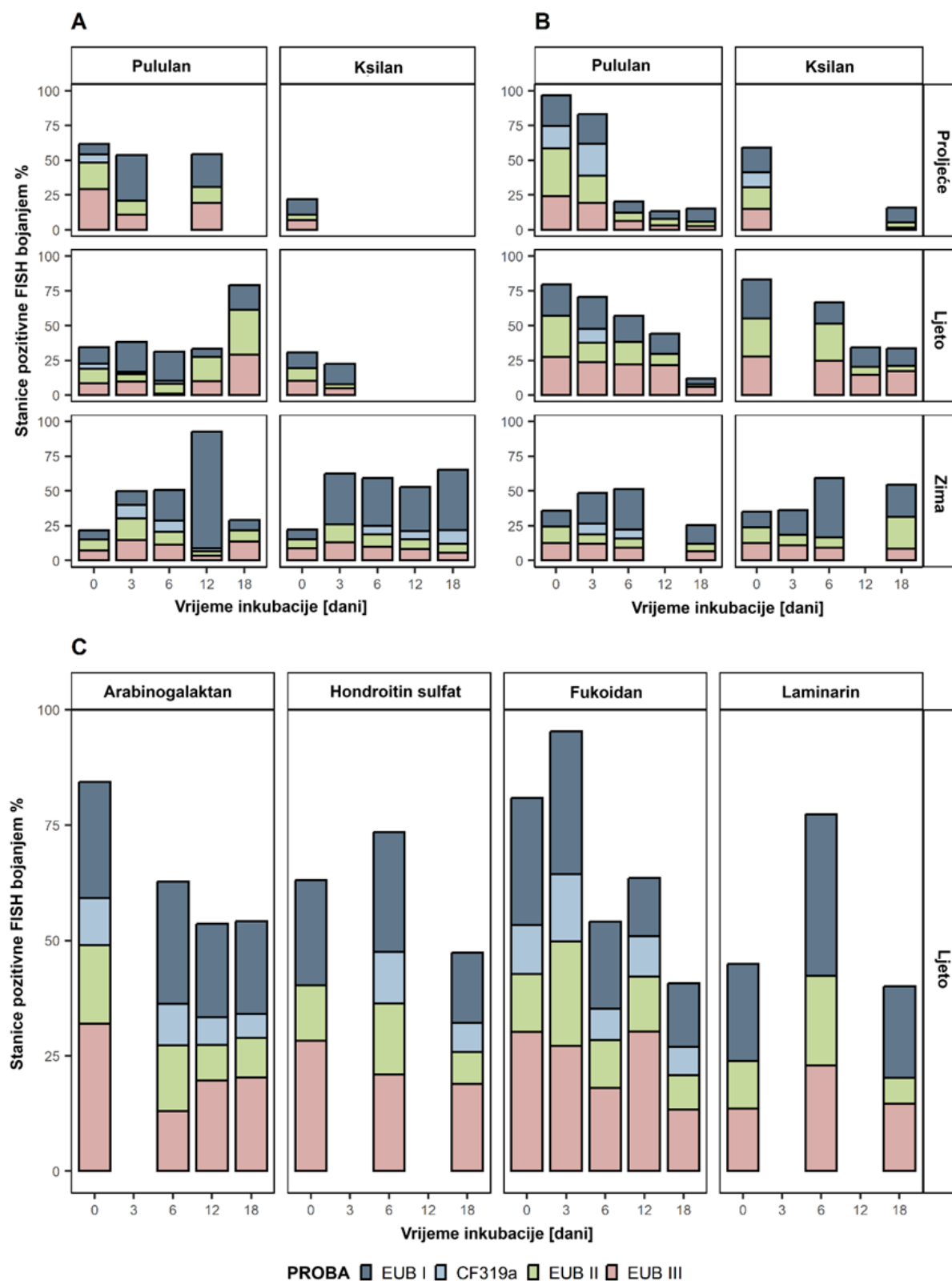
4.2.7. Kvantifikacija brojnosti bakterija u FLAPS inkubacijama temeljena na FISH analizi

FISH analiza rađena je na uzorcima iz pululan i ksilan inkubacija iz oba jezera (Kozjak i Crniševo) te, dodatno, na uzorcima iz svih ljetnih inkubacija iz Crniševa, jer su ti uzorci pokazali najveći udio stanica obojenih polisaharidom (Slika 33). Za provođenje FISH tehnike korištene su fluorescentne probe EUB-I, EUB-II, EUB-III i CF319a kako bi se identificirale sve bakterije (EUB-I), Planctomycetota (EUB-II), Verrucomicrobiota (EUB-III) odnosno Bacteroidota (CF319a). Pozitivne stanice s CF319a oduzete su od pozitivnih stanica s EUB-I jer EUB-I također pokriva domenu CF319a. Pozitivni signali stanica obojeni fluorescentnim probama i polisaharidom uspoređeni su s rezultatima analize mikrobne raznolikosti kako bi se definirale potencijalno sebične bakterije u kraškim jezerima.

Ukupna brojnost bakterija definirana je kao kumulativni broj bakterijskih stanica koje pokazuju pozitivan signal sa svim probama. U nekim uzorcima doseg ukupne brojnosti bakterija sa svim probama bio je 25-50%, čak i nakon uključivanja Cyanobacteria ili stanica s autofluorescentnim signalom (Slika 37). Razlog tome mogao bi biti taj što Actinobacteriota, koje čine do 40% zajednice, ima ograničenu detekciju FISH tehnikom zbog male veličine frakcije i niskog ukupnog sadržaja ribosoma [198].

U Kozjaku najveću brojnost identificiranih stanica FISH tehnikom pokazale su sve bakterije (EUB-I) tijekom zime (Slika 37A). Tijekom proljeća najzastupljenije su bile EUB-III pozitivne stanice odnosno Verrucomicrobiota, dok su tijekom ljeta najzastupljenije bile EUB-II pozitivne Planctomycetota. CF319a pozitivne stanice odnosno Bacteroidota su bile zastupljenije zimi.

U Crniševo, koljena Planctomycetota (EUB-II) i Verrucomicrobiota (EUB-III) su imali najveću brojnost identificiranih bakterijskih stanica pomoću FISH tehnike (Slika 37B i C). CF319a pozitivne stanice odnosno Bacteroidota imale su veću brojnost u proljeće u pululan i ksilan inkubacijama (Slika 37B), a ljeti u svim inkubacijama osim laminarina (Slika 37C). EUB-III pozitivne stanice odnosno Verrucomicrobiota dominirale su zajednicama u proljeće i ljeto (Slika 37 B i C), dok su preostale bakterije (EUB I) dominirale zimskim zajednicama (Slika 37C).



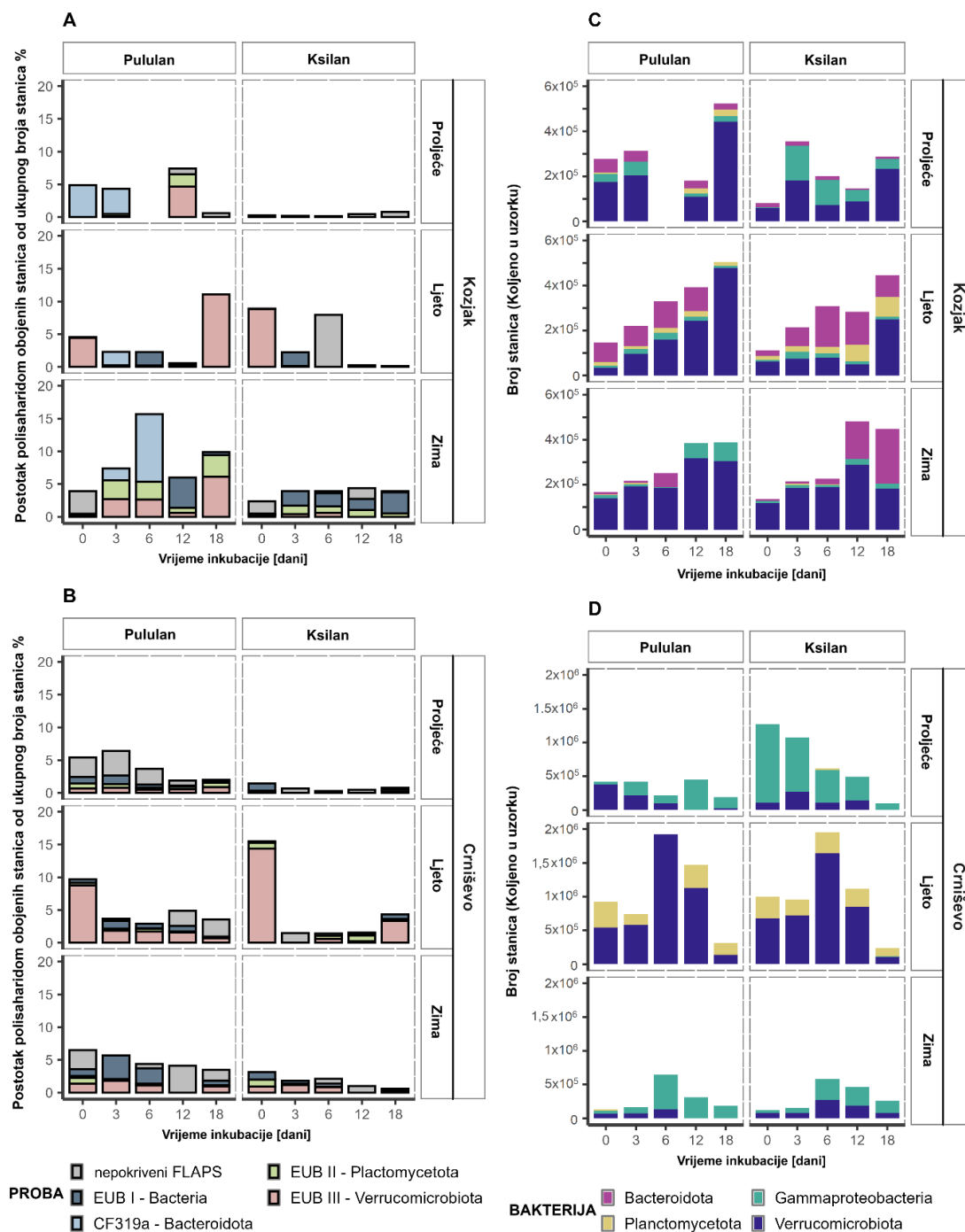
Slika 37. Postotak FISH pozitivnih bakterijskih skupina izbrojanih FISH-om tijekom inkubacija s pululanom i ksilanom u različitim sezonama uzorkovanja u Kozjaku (A), Crniševu (B) i različitim polisaharidima na ljeto u Crniševu (C).

4.2.8. Identifikacija sebičnih bakterija pomoću FISH-a i sekvenciranja

Sebično aktivne bakterije taksonomski su identificirane koristeći kombinaciju bojanja FLAPS-a i FISH-a. Koristeći probe EUB-I, EUB-II, EUB-III i CF319a, karakterizirano je ukupno 82% sebičnih bakterija u svim jezerima, godišnjim dobima i inkubacijama s polisaharidima. Nadalje, uspoređeni su FLAPS-FISH rezultati, koji daju taksonomsku identifikaciju na razini koljena, s analizom zajednice sekvenciranjem amplikona gena 16S rRNA kako bi se identificirali specifični bakterijski rodovi koji bi mogli biti sebično aktivni u jezerima.

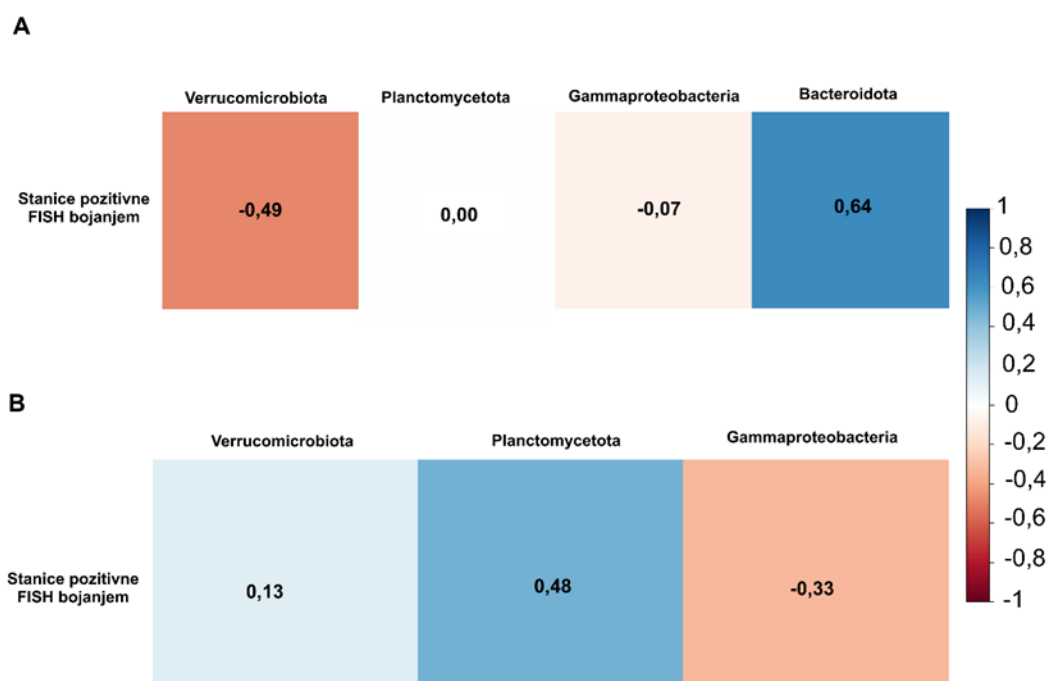
U Kozjaku su sve ciljane bakterijske skupine (Bacteroidota, Planctomycetota i Verrucomicrobiota) polisaharide razgrađivale sebičnim mehanizmom, a njihova aktivnost varirala je ovisno o sezoni i vremenskom periodu inkubacije. Bakterije iz koljena Bacteroidota pokazale su razgradnju pululana sebičnim mehanizmom na zimu tijekom prvih 6 dana inkubacija (Slika 38A). Bakterije iz koljena Verrucomicrobiota pokazale su razgradnju pululana sebičnim mehanizmom na početku i na kraju inkubacija. Zimi su bakterije iz sva tri koljena pokazala razgradnju pululana sebičnim mehanizmom (Slika 38A). U inkubaciji sa ksilanom bilo je manje identificiranih sebičnih stanica, pri čemu su samo bakterije iz koljena Verrucomicrobiota pokazale visoku sebičnu aktivnost tijekom ljetne inkubacije na 0. dan (Slika 38A).

Apsolutna brojnost izračunata za usporedbu rezultata FISH i rezultata mikrobne raznolikosti pokazala je rast broja stanica bakterija iz koljena Bacteroidota tijekom ljetnih i zimskih inkubacija (Slika 38C), iako nisu bile sebično aktivne (Slika 38A). Tijekom ljeta, bakterije iz koljena Planctomycetota i Verrucomicrobiota pokazale su rast kroz vremenski period inkubacija (Slika 38C). Bakterije iz razreda Gammaproteobacteria imale su povećan broj stanica tijekom zime, a smanjen tijekom proljeća (Slika 38C).



Slika 38. Apsolutni broj stanica obojenih polisaharidom (%) izbrojan FISH-om u inkubacijama pululana i ksilana u različitim sezonama uzorkovanja u Kozjaku (A) i Crniševu (B). Probe su označene bojama, a neidentificirane sebične stanice obojene su u sivo i označene kao nepokriveni FLAPS. Apsolutna brojnost koljena Bacteroidota, Planctomycetota i Verrucomicrobiota i razreda Gammaproteobacteria u inkubacijama pululana i ksilana u Kozjaku (C) i Crniševu (D) izračunata iz normalizacije rezultata 16S sekvenciranja i ukupnog broja stanica.

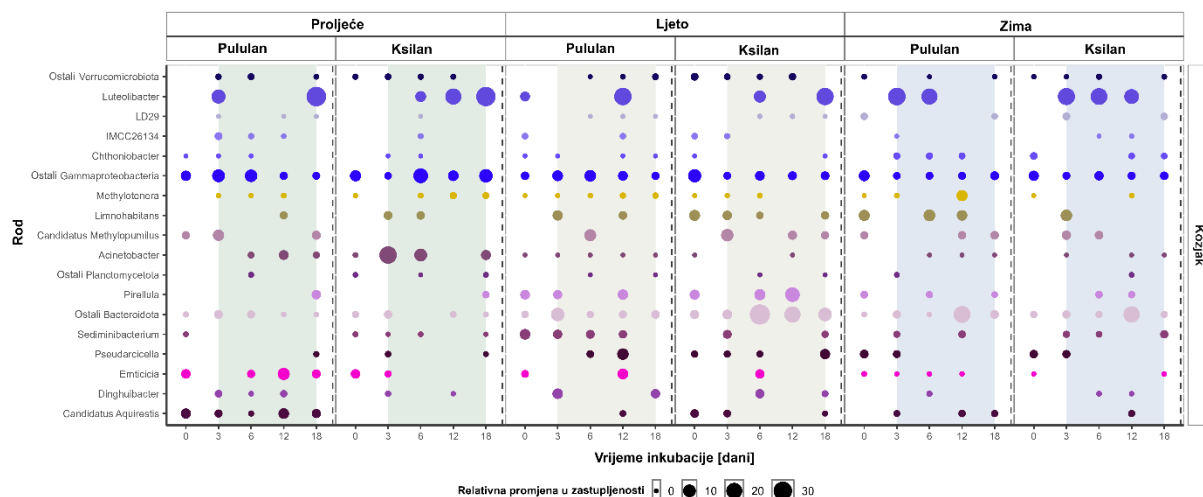
Pozitivna korelacija između izračunate apsolutne brojnosti Bacteroidota i brojnosti FISH-om potvrđena je Spearmanovim koeficijentom korelacije, dok su apsolutna brojnost Verrucomicrobiota i brojnost FISH-a imale negativnu korelaciju (Slika 39A).



Slika 39. Izračunati koeficijent korelacije pokazao je pozitivnu ili negativnu korelaciju između normaliziranog broja stanica koljena i broja FISH ili ukupnog broja DAPI u Kozjaku (A) i Crniševu (B).

Analiza mikrobne raznolikosti korištena je kako bi se moglo pretpostaviti koji od bakterija su rodovi koji su sebični organizmi u jezeru Kozjak. Stoga se pretpostavlja kako su rodovi *Candidatus Aquirestis* i *Emticicia* iz koljena Bacteroidota sebično razgradile pululan u proljeće, rodovi *Dinghuibacter* i *Sediminibacterium* iz istog koljena na ljeto, a rod *Pseudarcicella* na zimu (Slika 40). Rod *IMCC26134* iz koljena Verrucomicrobiota sebično je razgrađivao i pululan i ksilan na ljeto, dok je rod *Chthoniobacter* razgradio pululan u proljeće i na zimu, rod *Luteolibacter* na ljeto i rod *LD29* na zimu. Rod *Pirellula* iz koljena Planctomycetota na zimu je sebično razgradio oba polisaharida. Rodovi *Candidatus Methylopumilus* i *Methyлотenera* iz

razreda Gammaproteobacteria sebično su razgrađivali pululan, dok je rod *Acinetobacter* s rodnom *Limnohabitans* sebično razgradio ksilan, ljeti odnosno zimi (Slika 40).

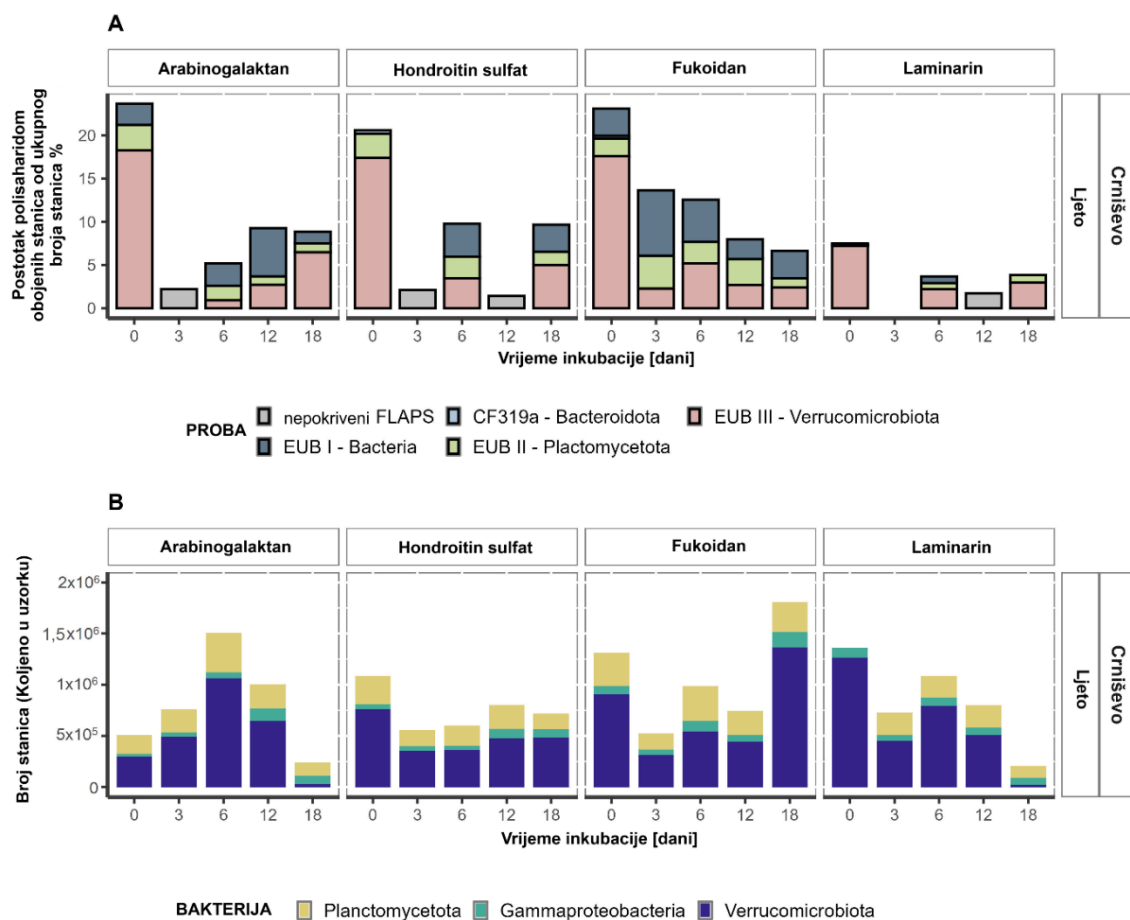


Slika 40. Relativna zastupljenost rod-specifičnih sekvenci povezanih s Bacteroidota, Planctomycetota, Gammaproteobacteria i Verrucomicrobiota u inkubacijama pululana i ksilana u Kozjaku.

U Crniševu, bakterije iz koljena Verrucomicrobiota su pokazale sebično uzimanje svih polisaharida (Slika 38B i Slika 41A). Iznenadujuće, nije bilo sebično aktivnih Bacteroidota ni u jednoj od inkubacija. Preostale bakterije (EUB I) i Planctomycetota pokazale su mali sebični unos pululana i ksilana tijekom svih godišnjih doba i visoku sebičnu aktivnost za fukoidan ljeti (Slika 41A). Ukupno, navedene bakterije činile su 78% ukupnih sebičnih bakterija u Crniševu.

Izračunata apsolutna brojnost pokazala je da su bakterije koljena Verrucomicrobiota najbrojnije (Slika 38D i 41B), što odgovara njihovoj sebičnoj aktivnosti. Planctomycetota je imala veću brojnost ljeti u svim inkubacijama i nije ih bilo u ostalim godišnjim dobima. Nadalje, Gammaproteobacteria su imale nisku brojnost ljeti, ali veću brojnost u proljetnim i zimskim inkubacijama pululana i ksilana (Slika 38B i D).

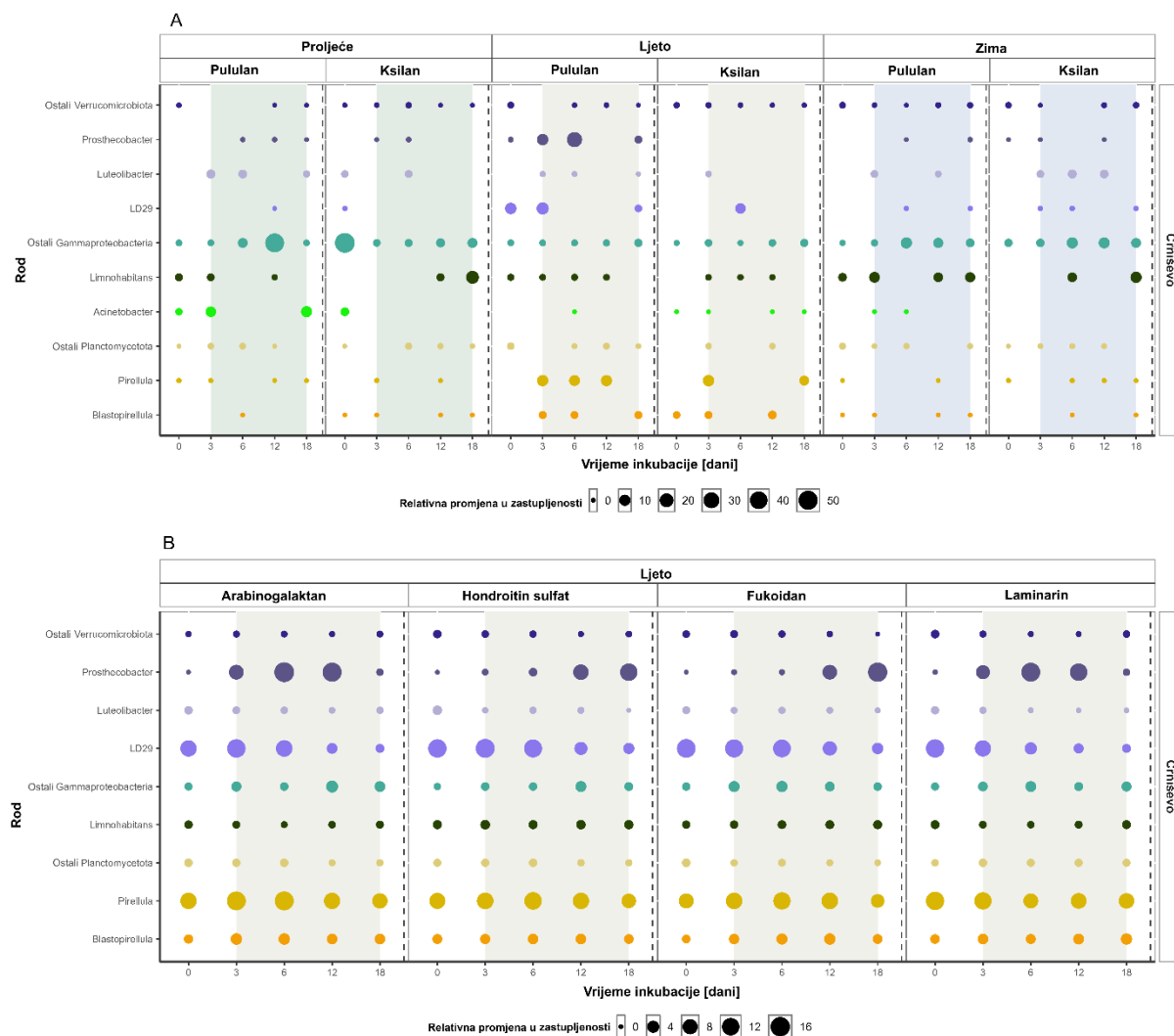
Pozitivna korelacija između izračunate apsolutne brojnosti Verrucomicrobiota i Planctomycetota s brojnosti FISH potvrđena je Spearmanovim koeficijentom korelacije, dok je Gammaproteobacteria imala negativnu korelaciju (Slika 39B).



Slika 41. Apsolutni broj stanica obojenih polisaharidom (%) izbrojan FISH-om u inkubacijama arabinogalaktana, hondroitin sulfata, fukoidana i laminarina na ljeto u Crniševu (A). Probe su označene bojama, a neidentificirane sebične stanice obojene su u sivo i označene kao nepokriveni FLAPS. Apsolutna brojnost koljena Planctomycetota i Verrucomicrobiota i razreda Gammaproteobacteria u inkubacijama na ljeto u Crniševu (B) izračunata iz normalizacije rezultata 16S sekvenciranja i ukupnog broja stanica.

Analiza mikrobne raznolikosti otkrila je potencijalne sebične bakterije u jezeru Crniševu. Tako se pretpostavlja kako su rodovi *LD29* i *Prostheobacter* iz koljena Verrucomicrobiota razgrađivali pululan i ksilan sebičnim mehanizmom tijekom ljeta, a rod *Luteolibacter* u proljeće i zimi (Slika 42A). Rod *Luteolibacter* je bio sebično aktivan tijekom ljeta za sve ostale polisaharide (Slika 42B). Rod *Pirellula* iz koljena Planctomycetota bio je sebično aktivan za sve polisaharide (Slika 42), dok je rod *Blastopirellula* iz istog koljena Planctomycetota bio aktivan tijekom ljeta (Slika 42B). Rod *Acinetobacter* iz razreda Gammaproteobacteria je sebično razgrađivao pululan i ksilan u proljeće i zimu (Slika 42A), a rod *Limnohabitans* je

sebično razgradio pululan na zimu i ksilan u proljeće (Slika 42A), te druga 4 polisaharida ljeti (Slika 42B).



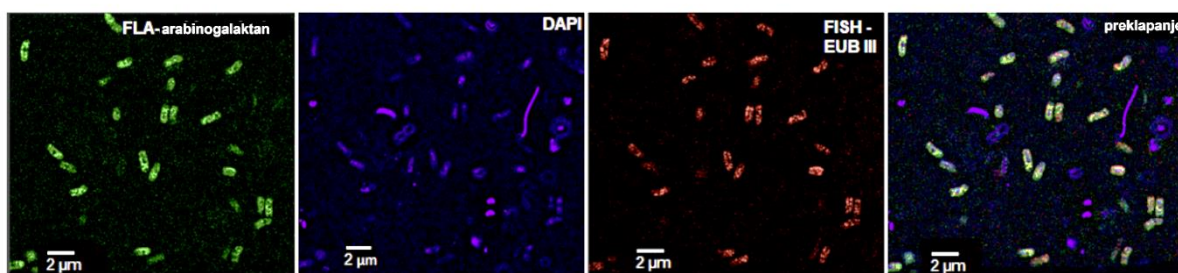
Slika 42. Relativna zastupljenost rodno specifičnih sekvenci povezanih s Planctomycetota, Gammaproteobacteria i Verrucomicrobiota u inkubacijama pululana i ksilana u Crniševu (A), te u inkubacijama arabinogalaktana, hondroitin sulfata, fukoidana i laminarina na ljeto u Crniševu (B).

4.2.9. Prostorno-vremenske razlike bakterijskih zajednica s predviđanjem sebično aktivnih bakterija u slatkovodnim jezerima

Sastav mikrobne zajednice razlikovao se ovisno o trofičkom stanju jezera i sezoni. Jezera većeg trofičkog stanja imaju veću raznolikost mikrobnih zajednica [199], stoga je mezotrofno

jezero Crniševo imao veću raznolikost u odnosu na oligotrofno jezero Kozjak. U periodu između dva cvjetanja fitoplanktona, kada je dostupna najveća količina hranjivih tvari, brojnost vrsta je porasla [200], a raznolikost pala, ukazujući na prisutnost samo određenih bakterija [201] (Tablica 4).

Usporedba rezultata FISH tehnike, FLAPS bojenja i 16S sekvenciranja omogućilo je identificiranje sebično aktivnih bakterija u krškim jezerima. Po prvi put dokazano je postojanje sebično aktivnih bakterija u slatkovodnim ekosustavima, kvantificirajući njihovu stopu aktivnosti i identificirajući ih taksonomski (Slika 43). Nekoliko bakterijskih rodova iz koljena Bacteroidota, Planctomycetota, Verrucomicrobiota i razreda Gammaproteobacteria identificirano je kao bakterije koje su sebično aktivne u slatkoj vodi. Sebično aktivne bakterije razlikovale su se prema jezeru, godišnjem dobu i polisaharidima.



Slika 43. Slike super-rezolucijskog oslikavanja stanica obojenih FLA-arabinogalaktanom, DAPI-ijem za nukleinsku kiselinu, FISH EUB-III probom i preklapanje svih signala u jezeru Crniševo tijekom ljetne inkubacije 0. dana.

Bakterije koljena Bacteroidota, posebno rod *Flavobacterium*, tipičan su pripadnik zimskih zajednica bakterija [202]. Također su ovisne o unosu DOC-a stoga su prisutnije u razdobljima i na mjestima koja karakterizira visoko vanjsko opterećenje DOC-om [19], kao što je jezero Kozjak tijekom zime (Slika 35 i 36). Veći udio Bacteroidota je u početku bilo prisutno u mezotrofnom jezeru Crniševo [203] (Slika 35), ali je njihova sebična aktivnost zabilježena samo u jezeru Kozjaku (Slika 38). U slatkovodnim ekosustavima bakterije koljena Bacteroidota imaju središnju ulogu u heterotrofnoj degradaciji složenog DOM-a, slično kao i u morskim i crijevnim ekosustavima, gdje također razgrađuju laminarin sebičnim mehanizmom [12]. Laminarin je linearni polisaharid glukoze, a u slatkovodnom ekosustavu nisu razgrađivali laminarin, već drugi linearni polisaharid glukoze, pululan. Rodovi bakterija iz koljena

Bacteroidota bili su aktivni ovisno o sezoni (Slika 38C) i uključeni su samo u sebično uzimanje pululana (Slika 38A). Tako je rod *Candidatus Aquirestis* bio aktivan u proljeće, a rod *Dinghuibacter* na ljeto (Slika 40). Oba roda su kemoorganotropi i prisutni u uvjetima visokih koncentracija DOC-a uzrokovanih cvjetanjem algi ili vanjskim unosom [204], što točno opisuje uvjete u jezeru Kozjak. Rod *Emticicia*, koji se prethodno povezivao s razgradnjom DOM-a [205], bio je sebično aktivan nakon cvjetanja fitoplanktona, u proljeće (Slika 40). Još jedan rod, koji se obično povezuje s cvjetanjem fitoplanktona u slatkovodnim sredinama, *Pseudarcicella* [206], bio je sebično aktivan tijekom zime, što je ovdje prepoznato kao početak cvjetanja fitoplanktona. Rod *Sediminibacterium* poznat je kao filotip unosa ugljika koji se obično nalazi u slatkovodnim tlima [207], stoga vjerojatno ima enzime potrebne za razgradnju pululana (Slika 40). Naime, pululan je polisaharid koji se najčešće povezuje s gljivom *Aureobasidium pullulas*, koja također se nalazi u tlu, između ostalih širokih okruženja u kojima se može pojaviti [208].

Tijekom ljetnog razdoblja bakterije koljena Planctomycetota pojavile su se u većem obilju (Slika 35 i 36) zbog utjecaja cvjetanja fitoplanktona koji im služi kao izvor hranjivih tvari [209]. Bakterije koljena Planctomycetota prethodno su bile identificirane kao sebično aktivne u morskom okolišu [8,10,86,192]. Te bakterije sadrže gene sulfataze i uključene su u razgradnju HMW-DOC kao što su sulfatirani polisaharidi iz algi [210] i stoga su zastupljenije u jezeru Crniševu. Također su bile aktivne tijekom ljeta u oba jezera i tijekom zime u Kozjaku (Slika 38 i 41). Rodovi *Pirellula* i *Blastopirellula* bili su prisutni i sebično aktivni u ljetnom Crniševu (Slika 42), kada je djelomični unos morske vode najveći [138], dok je samo rod *Pirellula* bio prisutan i sebično aktivan na zimu u Kozjaku (Slika 40). Razlog tome mogao bi biti to što je rod *Blastopirellula* više prilagođen morskim staništima, dok roda *Pirellula* ima u izobilju i u morskim [211] i u slatkovodnim staništima [212].

Sastav zajednice koljena Verrucomicrobiota u velikoj je mjeri ovisan o DOC-u [213], stoga je vrlo obilno prisutan u jezeru Kozjaku na zimu i u jezeru Crniševu na ljeto (Slika 35 i 36). Dominacija različitih rodova unutar zajednice Verrucomicrobiota uvelike je varirala od jezera do jezera (Slika 36). Na primjer, rod *Luteolibacter*, povezan s rizosferom kopnenih biljaka [214], dominira jezerom Kozjak s visokim udjelom alohtonog DOM-a (Slika 36A). Rod *Prostheco bacter*, povezan s planktonskim algama [215], dominirao je jezerom Crniševom s visokim udjelom autohtonog DOM-a (Slika 36B). Bakterije koljena Verrucomicrobiota bile su sebično aktivne rano u svim ljetnim inkubacijama polisaharida u jezeru Crniševu (Slika 38 i 41) jer su to vrste s najviše gena za iskorištavanje raznolikog skupa ugljikohidrata u

slatkovodnom okolišu [213]. U jezeru Kozjak, u inkubacijama s ksilanom i pululanom, rodovi *Chthoniobacter* i *IMCC26134* bili su sebično aktivni (Slika 40) jer su povezani s mikrobiomom tla i razgradnjom ugljikohidrata [216,217]. Rod *Luteolibacter* [218], koji je već prije bio dokazano sebično aktivan u morskom okolišu, i u slatkovodnom okolišu bio je sebično aktivan u svim inkubacijama polisaharida u oba jezera, zajedno s rodом *LD29* (Slika 40 i 42), bakterijama za koje je poznato da razgrađuju polisaharide [219]. Rod *LD29*, koji se pojavljuje u slanoj vodi i ima genetski potencijal za iskorištavanje polisaharida koji se nalaze u fitoplanktonu, bio je uvelike odgovoran za razgradnju autohtonih polisaharida sebičnim mehanizmom tijekom ljeta [220] (Slika 40 i 42). Konačno, sveukupno aktivan u inkubacijama u jezeru Crniševo, rod *Prostheobacter* (Slika 42) već prije prepoznat kao specijalist za razgradnju složenih polisaharida u slatkoj vodi, bio je sebično aktivan jer sadrži spektar gena za razgradnju ugljikohidrata [212].

Bakterije koljena Proteobacteria su dominirale početnim zajednicama obaju jezera (Slika 35 i 36), jer su to tipične bakterije oligotrofnih jezera [19] i krških voda [221]. Bakterija razreda Alphaproteobacteria su dominirale zajednicama nakon (Crniševo) ili tijekom cvatnje (Kozjak), posebno bakterije roda *Sphingorhabdus* (Slika 36), poznate po mogućnosti metabolizma organskih tvari [221]. U početku su bakterije razreda Gammaproteobacteria bile prisutne u većem obilju nakon cvjetanja fitoplanktona, u proljeće (Slika 35), s dominacijom rodova *Candidatus Methylopusillus* i *Acinetobacter* (Slika 36), povezanih s biorazgradnjom [222]. Određeni rodovi razreda Gammaproteobacteria poznati su kao sebični organizmi u morskom okolišu [11]. U slatkovodnim jezerima veliki broj stanica bio je pozitivan na obojenje FISH tehnikom s probom EUB-I i FLAPS obojenjem, a za njih se pretpostavlja da su bakterije iz razreda Gammaproteobacteria, točnije rodovi *Acinetobacter* i *Limnohabitans* (Slika 40 i 42). Rod *Acinetobacter* poznat je po sposobnosti iskorištavanja polisaharida u slatkovodnim okolišima [223]. Rod *Limnohabitans*, prethodno otkriven kao kolonizator fitoplanktona sposoban za razgradnju eksudata algi, proteina i polisaharida [194], bio je sebično aktivniji u inkubacijama s autohtonim polisaharidima (Slika 42). Uočena je negativna korelacija između brojnosti FISH i izračunate apsolutne brojnosti Gammaproteobacteria i Verrucomicrobiota (Slika 39). To bi moglo imati nekoliko razloga: jedna od mogućnosti je da stanice iz rastućih članova ovih filogenetskih skupina nisu dobro pokrivene korištenom probom za FISH, ali su detektirane početnicama koje se koriste za pojačavanje i sekvenciranje gena 16S rRNA. To bi moglo dovesti do povećanja njihove izračunate apsolutne brojnosti, dok brojnost FISH

analizom ostaje nepromijenjen. Alternativno, ako stanice određene subpopulacije nisu aktivne, FISH ih možda neće učinkovito detektirati zbog niskog broja ribosoma u stanici, unatoč tome što su pojačani i detektirani u sekvenciranju gena 16S rRNA. S druge strane, također je moguće da su stanice iz određene skupine pokrivene FISH probom, ali ne i početnicama koje se koriste za amplifikaciju gena 16S rRNA, što bi moglo rezultirati povećanjem brojnosti FISH analizom dok brojnost na temelju sekvenciranja amplikona ostaje nepromijenjen ili se čak smanjuje. Ove razlike u metodama kvantifikacije, kao što je različita pokrivenost probama ili početnicama, kao i fiziološke razlike u bakterijskim skupinama u pogledu broja ribosoma, mogle bi objasniti opažene negativne korelacije [224]. Nažalost, razlike u pokrivenosti početnica naspram proba ne mogu se procijeniti za ove specifične skupine, jer obje FISH probe ciljaju regije (Gamma 42a sonda čak cilja 23S rRNA) izvan amplificirane i sekvencirane V4 16S rRNA regije gena.

4.3. Treća faza istraživanja

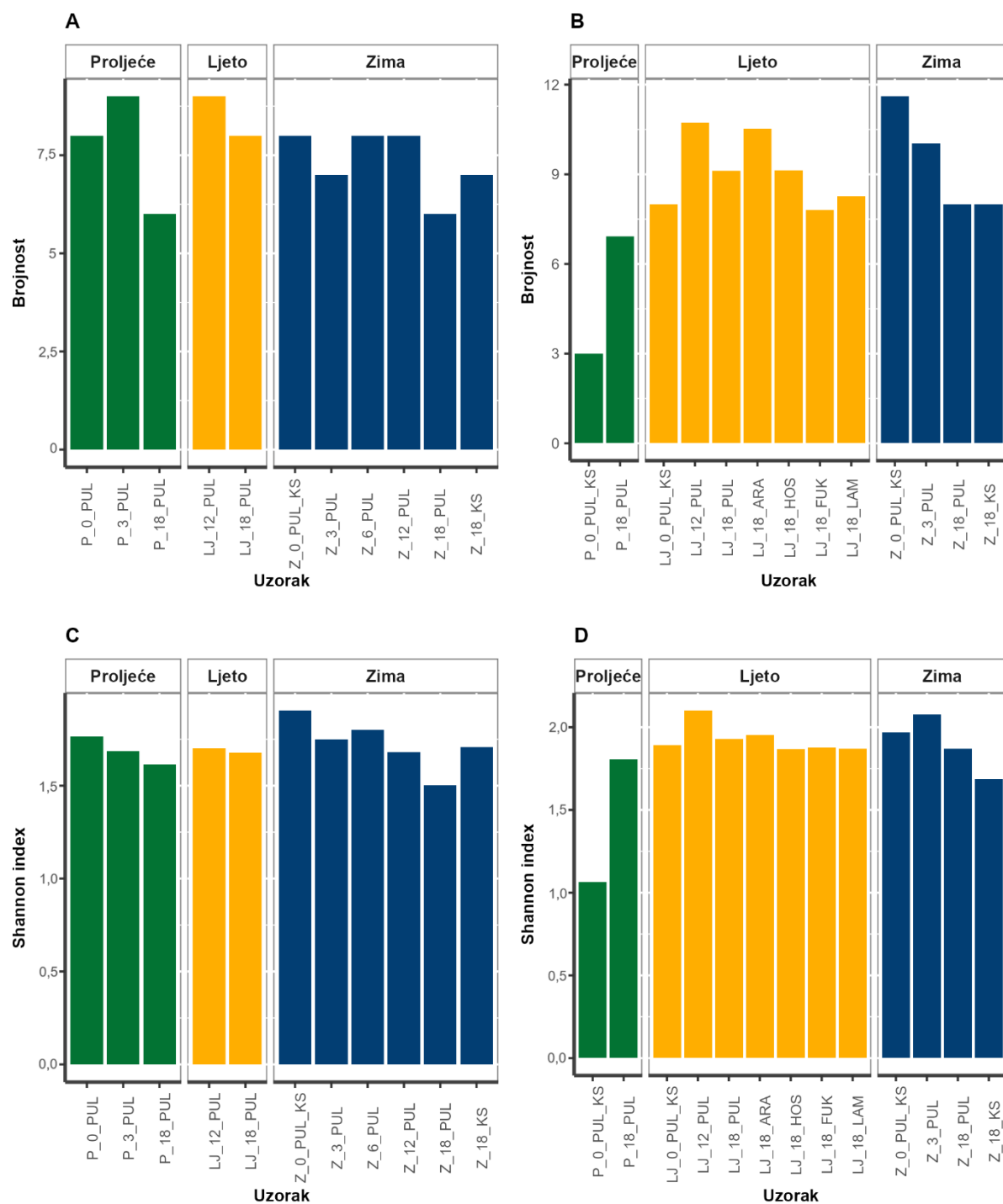
4.3.1. Taksonomska raznolikost metagenomskih sekvenci u različitim jezerima, sezonama i uvjetima inkubacija

Brojnost različitih bakterijskih koljena u Kozjaku najveća je bila 3. dan u proljetnoj i 12. dan u ljetnoj inkubaciji s pululanom, a najmanja na 18. dan u proljetnoj i zimskoj inkubaciji s pululanom (Slika 44A). U Crniševu najmanja brojnost bakterijskih koljena bila je u proljetnim inkubacijama s pululanom i ksilanom, a najveća na 0. dan u zimskoj inkubaciji s pululanom i ksilanom (Slika 44B).

Alfa raznolikost prema Shannon indeksu u Kozjaku je imala slične vrijednosti skroz sve sezone, najviša je bila na 0. dan zimske inkubacije s pululanom i ksilanom, a najniža 18. dan zimske inkubacije s pululanom (Slika 44C). U Crniševu najmanja alfa raznolikost izračunata je u proljetnim inkubacijama, dok je u ljetnim i zimskim imala slične vrijednosti (Slika 44D).

U jezeru Kozjak, jednosmjerni ANOVA test pokazao je da nema značajne razlike u brojnosti bakterijskih zajednica između sezona ($p = 0,42$), različitih polisaharida ($p = 0,81$) ni dana inkubacije ($p = 0,12$). Također, nije bilo statistički značajne razlike ni u raznolikosti vrsta prema Shannon indeksu između sezona ($p = 0,88$), različitih polisaharida ($p = 0,13$), dok je između dana inkubacija bilo statistički značajne razlike ($p = 0,009$).

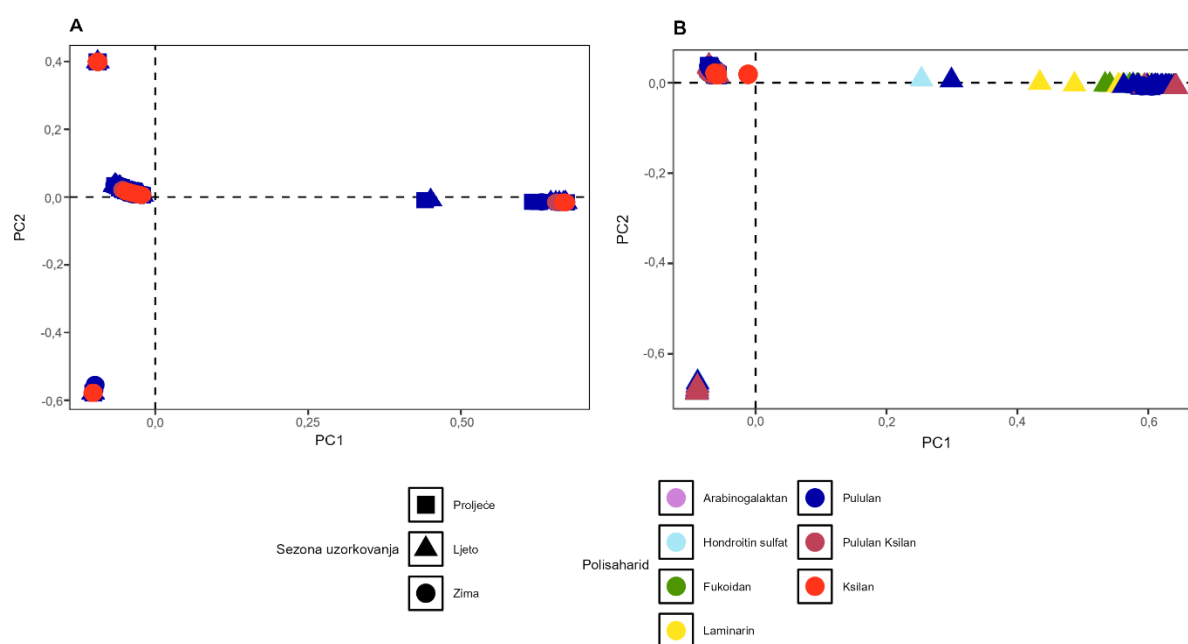
U jezeru Crniševu, jednosmjerni ANOVA test potvrdio je značajnu razliku u brojnosti bakterijskih zajednica između sezona ($p = 0,02$). Tukeyev test (HSD) potvrdio je značajnu razliku brojnosti vrsta proljeća od zajednica ljeti ili zimi ($p = 0,022$). Kruskal-Wallis test pokazao je da nema statistički značajne razlike u raznolikosti vrsta prema Shannon indeksu između sezona ($p = 0,14$), različitih polisaharida ($p = 0,73$), te dana inkubacije ($p = 0,18$).



Slika 44. Alfa raznolikost bakterijskih zajednica temeljena na metagenomskom sekvenciranju određena kao brojnost u jezerima Kozjak (A) i Crniševo (B), te raznolikost prema Shannon indeksu u jezerima Kozjak (C) i Crniševo (D).

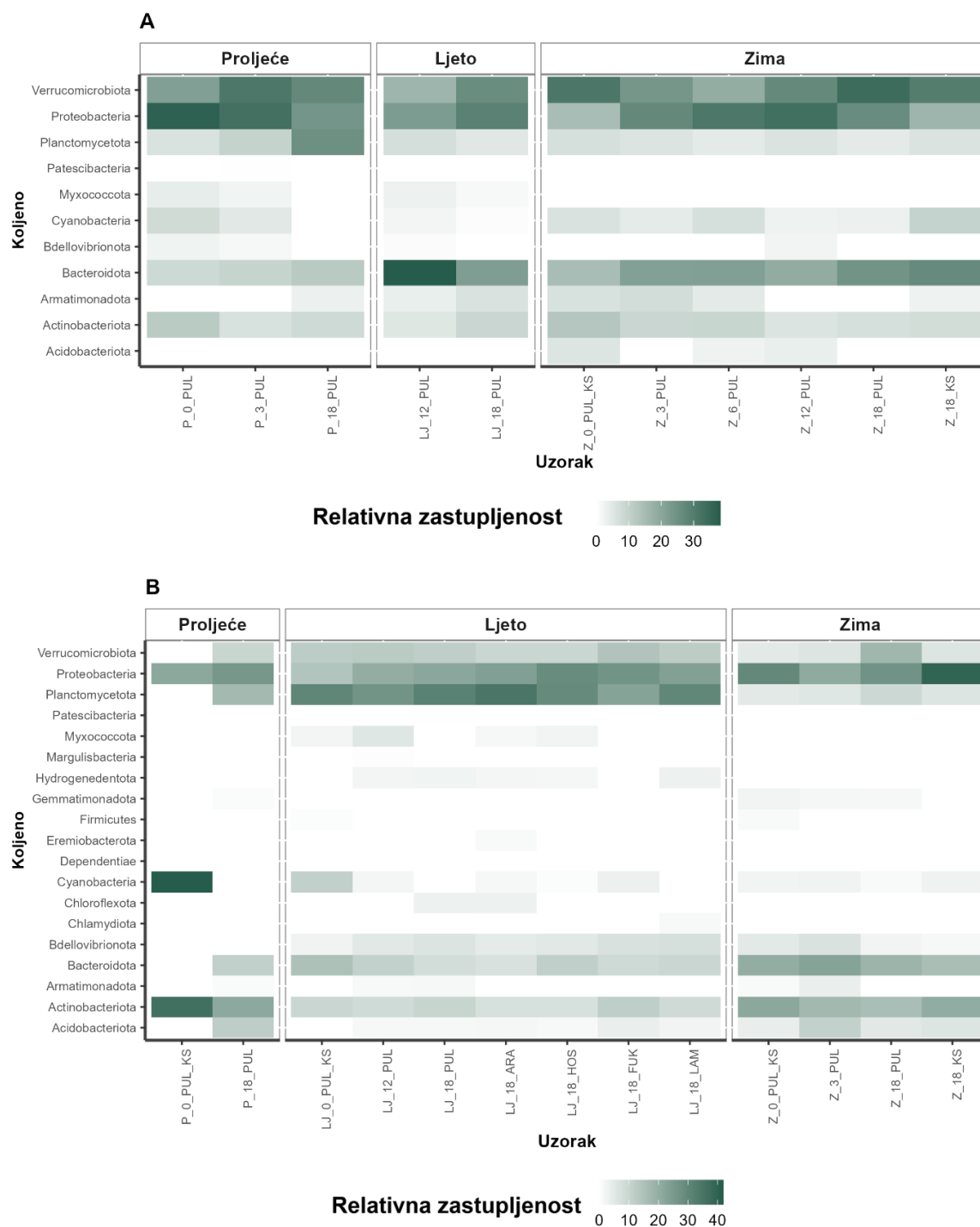
Unutar jezera Kozjak, sastav bakterijske zajednice slabo, ali značajno se razlikovao između uzorkovanih sezona (Slika 45A; PERMANOVA: $R^2 = 0,01$, $p = 0,001$), isto kao i između dana inkubacije (PERMANOVA: $R^2 = 0,003$, $p = 0,001$), i različitih polisaharida (PERMANOVA: $R^2 = 0,003$, $p = 0,001$). Unutar proljeća dokazana je slaba, ali značajna razlika između zajednica različitih dana inkubacije (PERMANOVA: $R^2 = 0,01$, $p = 0,001$), a u ljeto i zimu razlika nije bila značajna. Unutar zime razlika između zajednica u različitim polisaharidima bila je slabo značajna (PERMANOVA: $R^2 = 0,005$, $p = 0,07$).

Unutar jezera Crniševo, sastav bakterijske zajednice slabo, ali značajno se razlikovao između uzorkovanih sezona (Slika 45B; PERMANOVA: $R^2 = 0,006$, $p = 0,001$), isto kao i između različitih polisaharida (PERMANOVA: $R^2 = 0,007$, $p = 0,02$), i dana inkubacije (PERMANOVA: $R^2 = 0,001$, $p = 0,03$). Unutar tri sezone jedino je u zimu dokazana statistički značajna razlika između zajednica inkubiranih s različitim polisaharidima (PERMANOVA: $R^2 = 0,009$, $p = 0,02$).



Slika 45. PCoA bakterijskih zajednica u Kozjaku (A) i Crniševu (B) β raznolikosti na temelju Bray-Curtisove različitosti. Utjecaj različitih sezona uzorkovanja, dodanih polisaharida i dana inkubacije testiran je PERMANOVA testom. Različite boje predstavljaju polisaharide, a različiti oblici predstavljaju sezone uzorkovanja.

U jezeru Kozjak identificirano je 11 različitih koljena u bakterijskoj zajednici (Slika 46A), a u jezeru Crniševo 21 (Slika 46B).

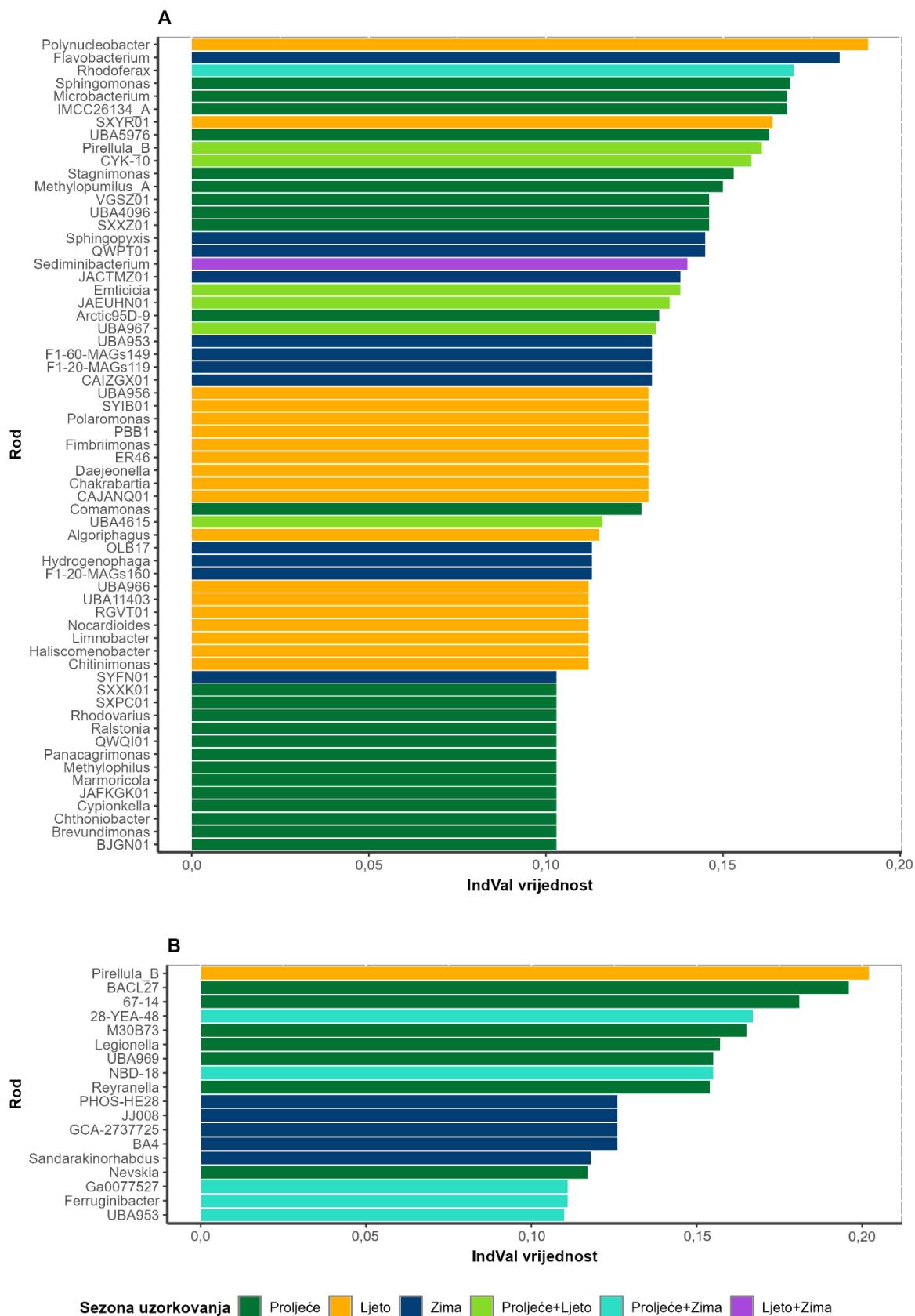


Slika 46. Relativna zastupljenost ukupne strukture bakterijske zajednice (razina koljeno) u jezerima Kozjak (A) i Crniševo (B), podijeljena po sezonama uzorkovanja. Kratice uzoraka odnose se na inkubacije s različitim polisaharidima i dan inkubacije.

U Kozjaku, u proljeće su zajednice tijekom inkubacije prošle promjenu od dominacije Proteobacteria i Verrucomicrobiota do podjednake dominacije s Planctomycetota (Slika 46A). Ljeti su Bacteroidota dominirale 12. dan, nakon čega se njihova zastupljenost smanjila, dok su Proteobacteria i Verrucomicrobiota postale zastupljenije (Slika 46A). Tijekom zimskih inkubacija zastupljenost Verrucomicrobiota i Bacteroidota povećavala se s vremenom inkubacije, dok je zastupljenost Proteobacteria opadala (Slika 46A). U proljetnoj inkubaciji, na 0. dan dominirali su rodovi *Cyanobium*, *Luteolibacter*, *NBD-18*, *Sphingomonas* i *Synechococcus*. Tijekom inkubacije, zastupljenost svih ovih rodova, osim *Luteolibacter*, se smanjila, pa su na 18. dan najzastupljeniji rodovi bili *Emticicia*, *Haloferula*, *JAEUHN01* i *Pirellula* (Dodatna slika 13A). U ljetnoj inkubaciji dominirao je rod *VI*, dok se zastupljenost rodova *Emticicia* i *SXYR01* smanjila, a roda *Luteolibacter* povećala kroz vrijeme inkubacije (Dodatna slika 13A). U zimskoj inkubaciji s pululanom i ksilanom isticali su se rodovi *Haloferula*, *JACTMZ01* i *Luteolibacter*, a u inkubaciji samo sa ksilanom *Flavobacterium*, *Haloferula* i *Sediminibacterium* (Dodatna slika 13A). U inkubaciji s pululanom zastupljenost *Haloferula*, *JACTMZ01*, *Luteolibacter* i *NBD-18* se smanjivala kroz vrijeme inkubacije, a zastupljenost *Flavobacterium* i *Prostheobacterium* povećavale (Dodatna slika 13A).

U Crniševu proljetnom inkubacijom na 0. dan dominirale su Actinobacteriota, Cyanobacteria i Proteobacteria, čije su se zastupljenosti smanjile, a povećale su se Acidobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota i Verrucomicrobiota (Slika 46B). U ljetnim inkubacijama dominirale su Planctomycetota i Proteobacteria, a u zimskim inkubacijama Actinobacteriota, Bacteroidota i Proteobacteria (Slika 46B). Rodovi *BACL27*, *Fonsibacter* i *Synechococcus* dominirali su 0. danom proljetne inkubacije, a njihova zastupljenost znatno se smanjila do kraja inkubacijskog vremena (Dodatna slika 13B). Ljetnim inkubacijama dominirali su rodovi *VI* i *Pirellula*, a ostali rodovi bili su prisutni u relativnoj zastupljenosti manjoj od 10% (Dodatna slika 13B). U zimskim inkubacijama nije bilo jasne dominacije između rodova, a u usporedbi s ostalim istaknuti su rodovi *Ga0077553* i *OMII01* (Dodatna slika 13B).

IndVal analizom identificirani su rodovi bakterija značajno povezani s određenim sezonskim uvjetima u jezerima Kozjak (47A) i Crniševo (47B).



Slika 47. Rezultati IndVal analize s identificiranim rodovima bakterija značajno povezanih s određenim sezonskim uvjetima u jezerima Kozjak (A) i Crniševo (B).

U jezeru Kozjak, s proljetnim uvjetima značajno je bilo povezano 24 roda, od kojih dominiraju *Sphingomonas*, *Microbacterium*, *IMCC26134_A*, *UBA5976*, *Stagnimonas* i *Methylopumilus* (Slika 47A). U ljeto je bilo identificirano 20 rodova, a najznačajniji su bili *Polynucleobacter*, *SXYR01*, *UBA956*, *SYB01*, *PBB1*, *Fimbriimonas*, *ER46*, *Daejeonella*, *Chakrabartia* i *CAJANQ01* (Slika 47A). U zimskim uvjetima identificirano je 12 rodova, a dominirali su *Flavobacterium*, *Sphingopyxis* i *QWPT01* (Slika 47A). Od rodova zajedničkih za više sezona isticali su se *Pirellula_B*, *CYK-10* i *Emticicia* za proljeće i ljeto, *Rhodoferrax* za proljeće i zimu i *Sediminibacterium* za ljeto i zimu (Slika 47A).

U zimskim inkubacijama s različitim polisaharidima značajno su bila povezana 3 roda bakterija (Dodatna slika 14A). Rod *Comamonas* s inkubacijom pululana i ksilana, a rodovi *Synechococcus_D* i *Sediminibacterium* su bili zajednički inkubacijama s pululanom i ksilanom, te inkubacijom sa ksilanom.

U jezeru Crniševo općenito je identificiran manji broj rodova koji su značajno povezani s sezonama (Slika 47B). S proljetnim uvjetima povezano je bilo 7 rodova, od koji su dominirali *BACL27* i *67-14*, a s ljetnim uvjetima jedino je bio povezan rod *Pirellula_B* (Slika 47B). Na zimu je identificirano 5 rodova (*PHOS-HE28*, *JJ008*, *GCA-2737725*, *BA4* i *Sandarakinorhabdus*). Proljeće i zima imali su 5 zajedničkih rodova, a istaknuli su se *28-YEA-48* i *NBD-18* (Slika 47B).

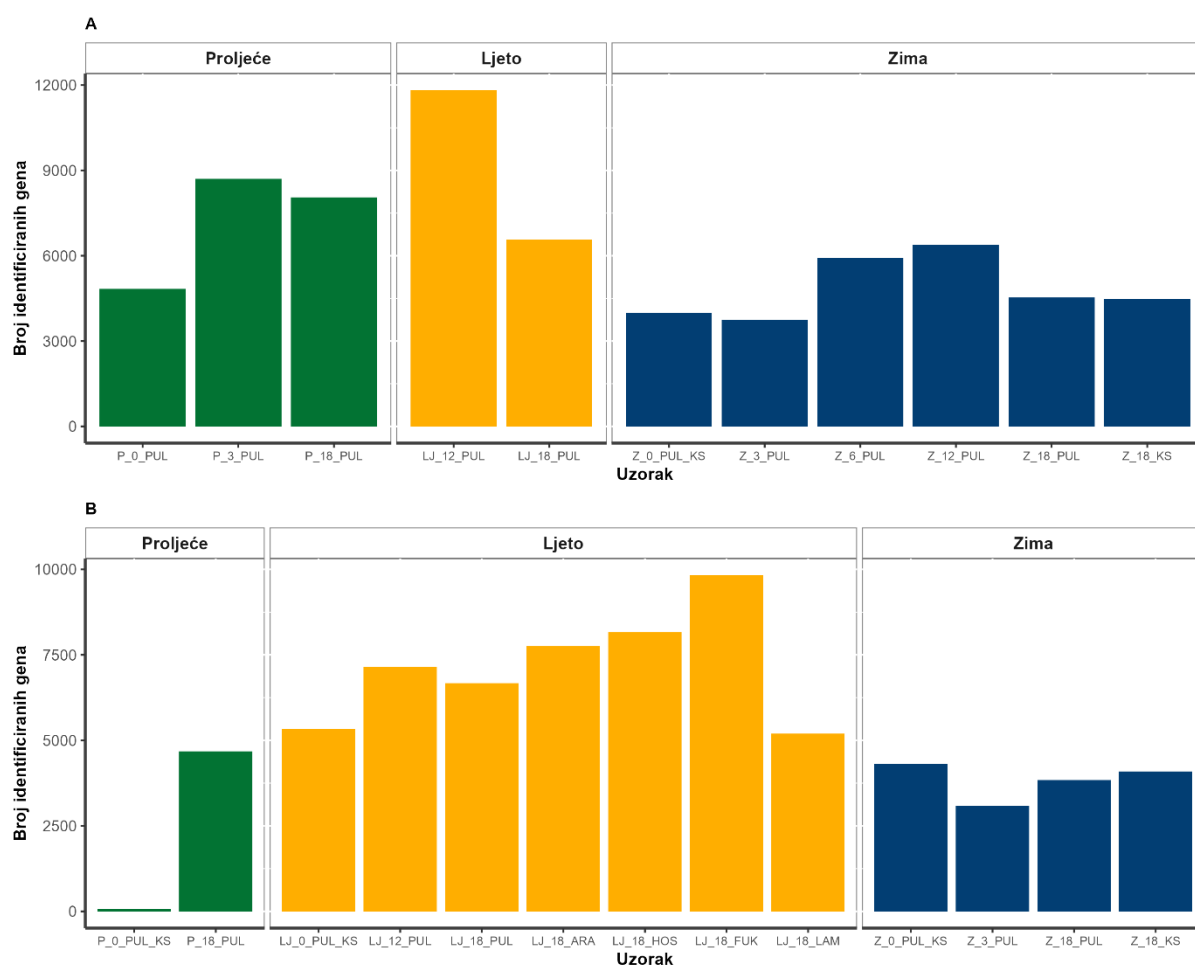
U proljetnim inkubacijama rodovi *Synechococcus_D* i *Fonsibacter* značajno su bili povezani s inkubacijom s pululanom i ksilanom (Dodatna slika 14B). U ljetnim inkubacijama rod *Stagnimonas* značajno je povezan s fukoidanom, rod *Aquiluna* s inkubacijom pululana i ksilana, a rodovi *Synechococcus_D* i *CAIKAF01* su bili zajednički inkubacijama s laminarinom te pululanom i ksilanom (Dodatna slika 14C).

4.3.2. Razlike u broju CAZymes gena između različitih jezera, sezona i uvjeta inkubacija

Broj gena koji kodiraju enzime aktivno djelujuće na ugljikohidrate (CAZymes) razlikovao se među uzorcima. U jezeru Kozjak u proljeće najmanji broj gena identificiran je na 0. dan, dok je u ljeto najmanje gena identificirano na 18. dan inkubacije s pululanom. Općenito je najmanji broj gena identificiran na 0. i 18. dan u zimskim inkubacijama s pululanom i ksilanom ili samo sa ksilanom (Slika 48A). Najveći broj gena identificiran je na 12. dan u ljetnoj inkubaciji s

pululanom. U zimskim inkubacijama broj identificiranih gena bio je manji nego u proljetnim i ljetnim inkubacijama (Slika 48A).

U jezeru Crniševo najmanji broj gena koji kodiraju CAZymes identificiran je na 0. dan u proljetnoj inkubaciji s pululanom i ksilanom (Slika 48B). U ljetnim inkubacijama s različitim polisaharidima identificiran je najveći broj gena, s najvišim brojem na 18. dan u inkubaciji s fukoidanom (Slika 48B).



Slika 48. Broj identificiranih gena koji kodiraju enzime aktivno djelujuće na ugljikohidrate (CAZymes) u različitim uzorcima u jezeru Kozjak (A) i Crniševo (B).

Statistička analiza broja identificiranih gena pokazala je značajne razlike između sezona i uvjeta inkubacije u oba jezera.

U jezeru Kozjak, Kruskal-Wallis test potvrdio je statistički značajnu razliku u broju identificiranih gena između sezona ($p < 2,3e-09$). Pairwise Wilcoxon test pokazao je da se broj

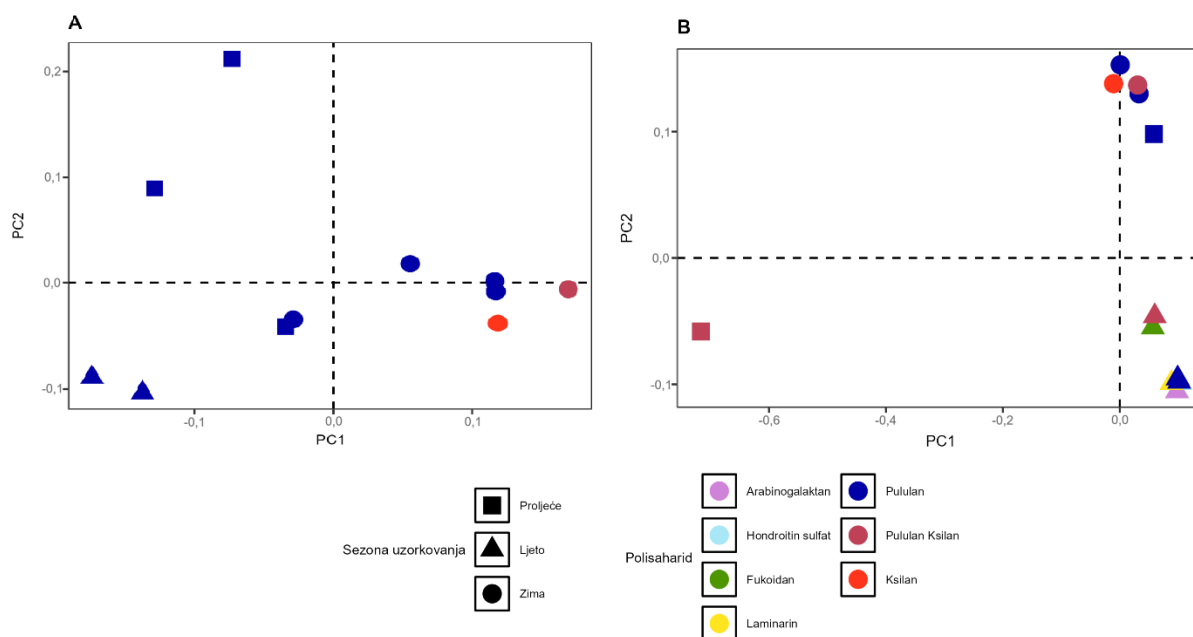
identificiranih gena u zimskom razdoblju statistički značajno razlikovao od broja gena u proljeće ($p = 1,4e-07$) i ljeto ($p < 3,6e-06$), dok razlika između proljeća i ljeta nije bila statistički značajna ($p = 0,6$). U proljeće je zabilježena statistički značajna razlika između dana inkubacije u broju identificiranih gena ($p = 0,003$), dok je u ljeto izostala ($p = 0,62$). Tijekom zime, broj identificiranih gena nije statistički značajno razlikovao kako između različitih polisaharida ($p = 0,43$), ni i između dana inkubacije ($p = 0,60$).

U jezeru Crniševo rezultati su pokazali sličan trend. Kruskal-Wallis test potvrdio je statistički značajnu razliku u broju identificiranih gena između različitih sezona ($p < 2,44e-05$), a Pairwise Wilcoxon test je otkrio da je zimska sezona statistički značajno odstupala ljeta ($p < 2,8e-05$), dok razlika između proljeća i zime, te proljeća i ljeta nije bila statistički značajna ($p = 0,92$, $p = 0,18$). U proljeće je između različitih polisaharida potvrđena statistički značajna razlika u broju identificiranih gena ($p = 0,009$). Nasuprot tome, u proljetnim i ljetnim inkubacijama nije bilo statistički značajne razlike između različitih polisaharida ($p = 0,63$, $p = 0,34$). Kada se promatralo trajanje inkubacije, u proljeće su zabilježene značajne razlike ($p = 0,009$), dok u zimskim i ljetnim uzorcima nije bilo statistički značajne razlike ($p = 0,61$, $p = 0,29$).

4.3.3. CAZymes geni identificirani u različitim jezerima, sezonama i uvjetima inkubacije

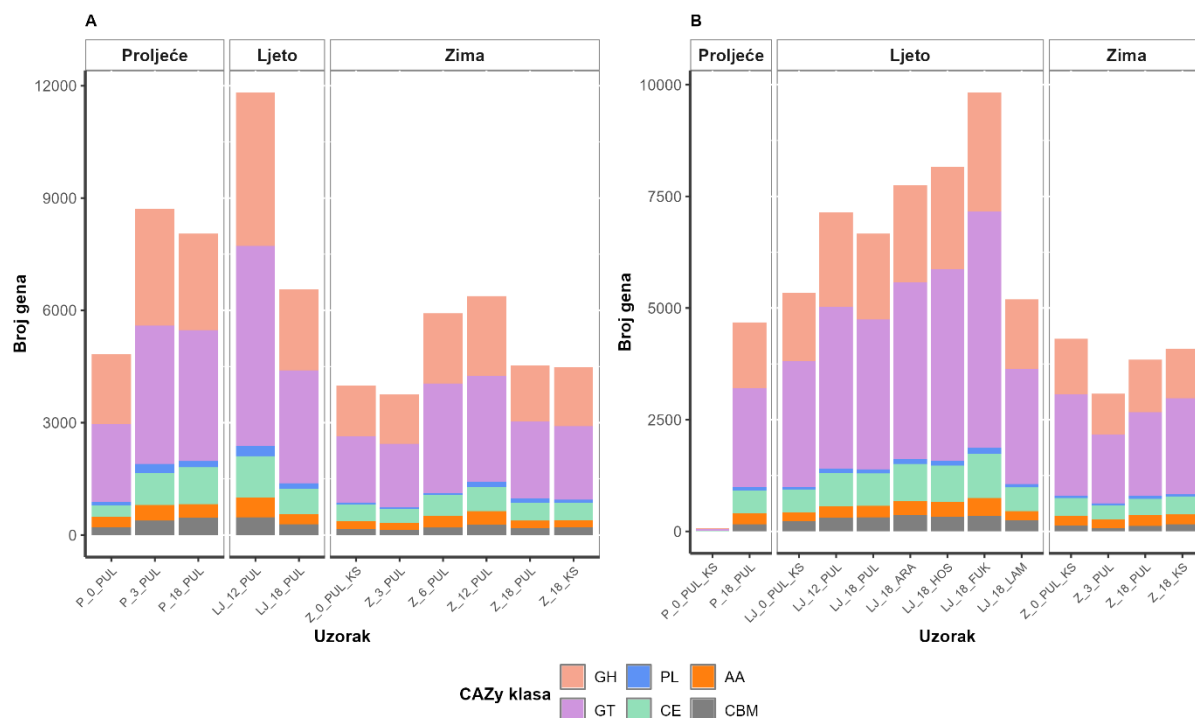
Unutar jezera Kozjak, sastav identificiranih gena koji kodiraju enzime aktivno djelujuće na ugljikohidrate značajno se razlikovao između uzorkovanih sezona (Slika 49A; PERMANOVA: $R^2 = 0,50$, $p = 0,002$), dok se između različitih polisaharida i dana inkubacije nije značajno razlikovao (PERMANOVA: $p > 0,05$). Unutar sezona nije bilo značajne razlike između zajednica različitih dana inkubacije (PERMANOVA: $p > 0,05$), ni između različitih polisaharida (PERMANOVA: $p > 0,05$).

Unutar jezera Crniševo, sastav identificiranih gena koji kodiraju enzime aktivno djelujuće na ugljikohidrate značajno se razlikovao između uzorkovanih sezona (Slika 49B; PERMANOVA: $R^2 = 0,45$, $p = 0,001$), isto kao i između dana inkubacije (PERMANOVA: $R^2 = 0,19$, $p = 0,03$), dok između različitih polisaharida (PERMANOVA: $p = 0,4$) nije bilo statistički značajne razlike. Unutar ljetnih inkubacija sastav identificiranih gena razlikovao se između različitih polisaharida (PERMANOVA: $R^2 = 0,92$, $p = 0,09$). Unutar tri sezone nije bilo statistički značajnih razlika između zajednica na različite dane inkubacija (PERMANOVA: $p > 0,05$).



Slika 49. PCoA identificiranih gena u Kozjaku (A) i Crniševu (B) β raznolikosti na temelju Bray-Curtisove različitosti. Utjecaj različitih sezona uzorkovanja, dodanih polisaharida i dana inkubacije testiran je PERMANOVA testom. Različite boje predstavljaju polisaharide, a različiti oblici predstavljaju sezone uzorkovanja.

Identificirani geni koji kodiraju enzime aktivno djelujuće na ugljikohidrate (CAZymes) obuhvaćali su šest različitih klasa: glikozidne hidrolaze (GH), glikoziltransferaze (GT), polisaharidne liaze (PL), ugljikohidratne esteraze (CE), pomoćne aktivnosti (AA) i module vezanja ugljikohidrata (CBM). U oba jezera najveći broj gena identificiran je kao glikoziltransferaze (GT) (Slika 50). GT geni bili su brojniji u Kozjaku, a razlika je pogotovo bila vidljiva u proljeće (Slika 50A). Glikozidne hidrolaze (GH) identificirane su kao drugi najbrojniji geni, te su bile brojnije u Kozjaku (Slika 50A), a ugljikohidratne esteraze (CE) kao treće. Geni identificirani kao pomoćne aktivnosti (AA) i moduli vezanja ugljikohidrata (CBM) bili su brojniji nego polisaharidne liaze (PL) pogotovo u zimskim inkubacijama u Crniševu (Slika 50B).

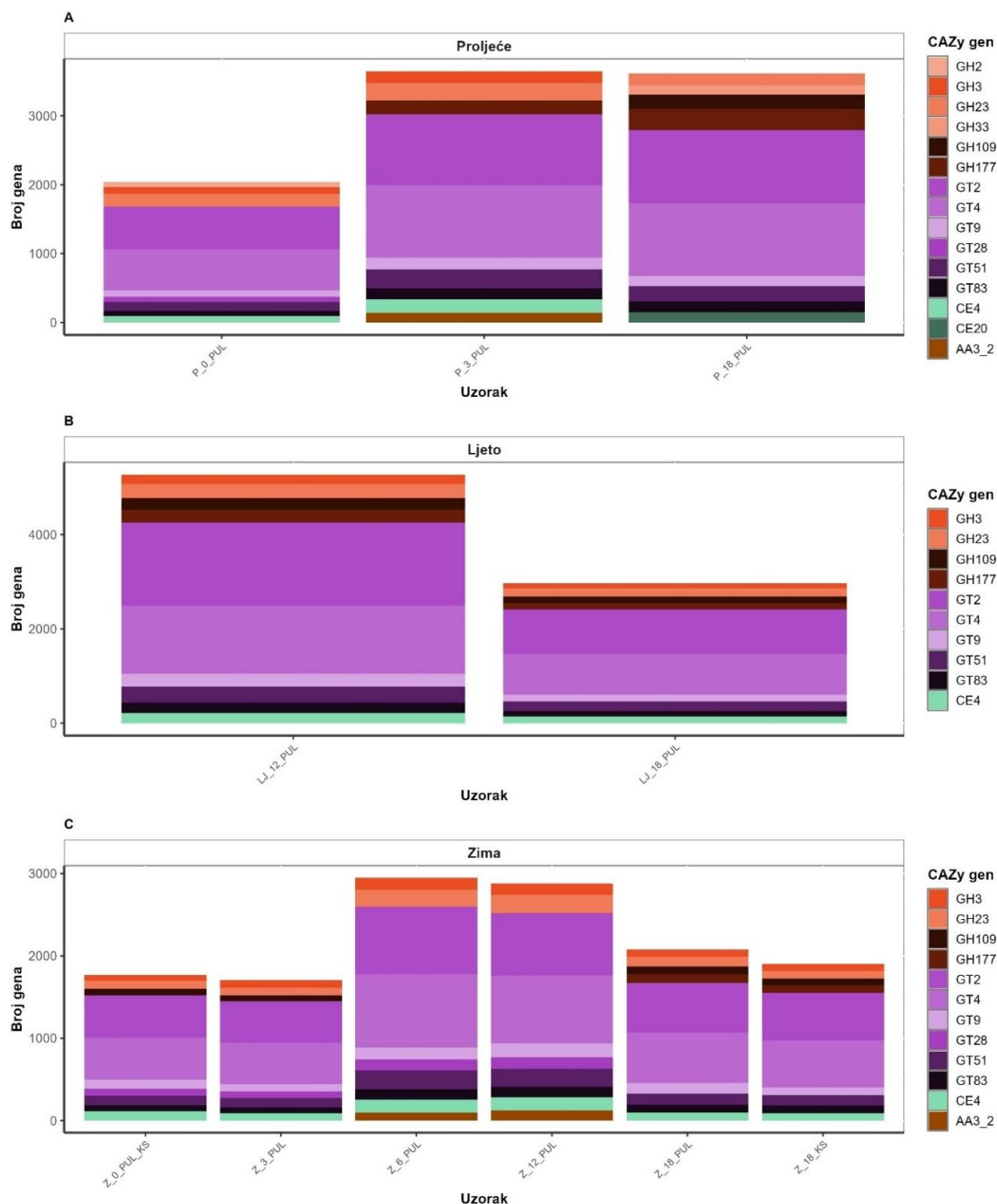


Slika 50. Broj identificiranih CAZy klasa u jezeru Kozjak (A) i Crniševu (B). Cazymes klase: glikozidne hidrolaze (GH), glikoziltransferaze (GT), polisaharidne liaze (PL), ugljikohidratne esterase (CE), pomoćne aktivnosti (AA) i module vezanja ugljikohidrata (CBM).

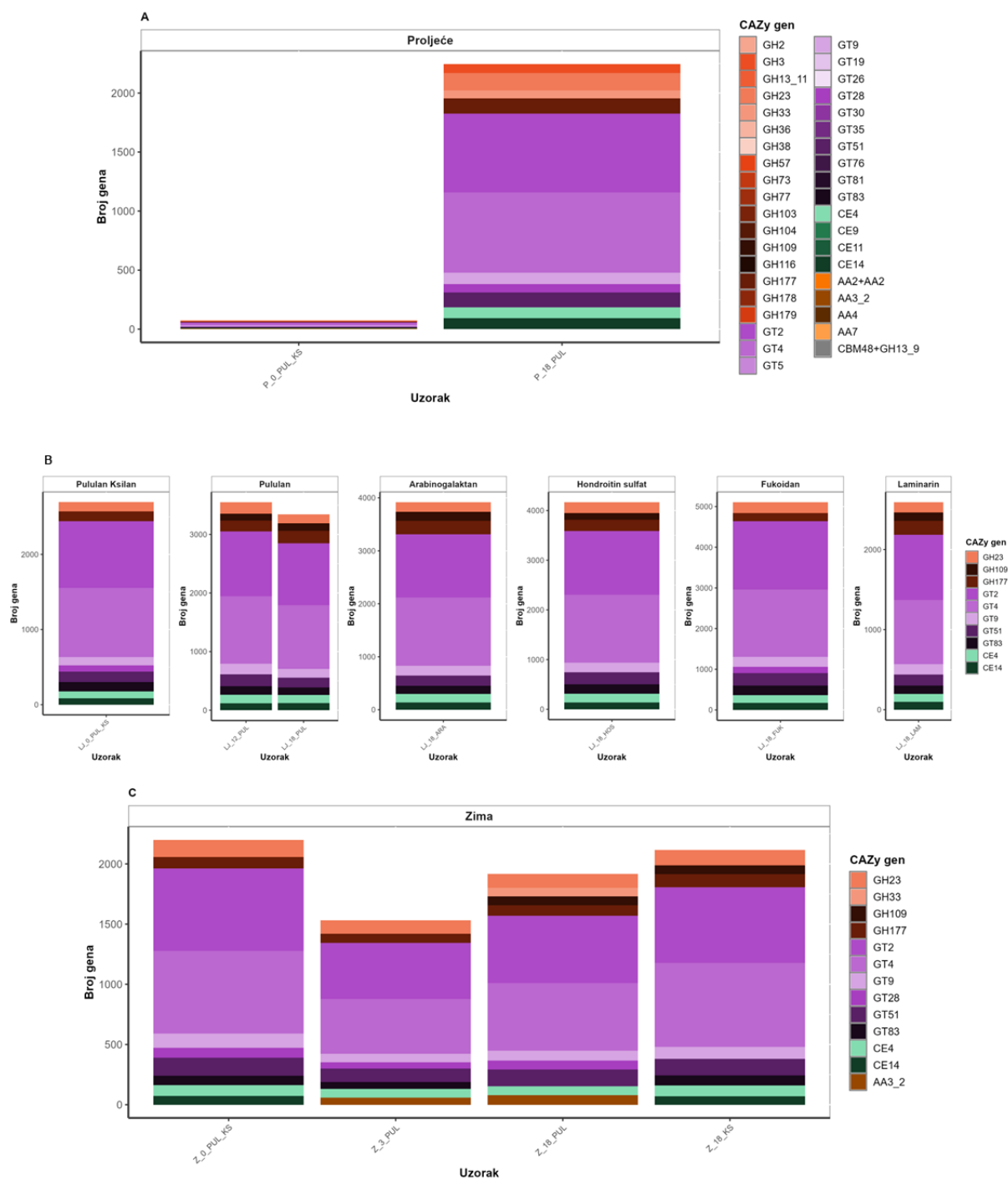
Unutar svakog jezera i sezone identificirani su najzastupljeniji gen (Slika 51 i 52). U oba jezera i svim uzorcima dominirali su isti geni, pri čemu su GT2 i GT4 bili najbrojniji u svim uvjetima. Određeni geni pojavljivali su se tek u kasnijim fazama inkubacija, tako je gen GH177 uvijek bio prisutan na kraju inkubacija pululana i ksilana u Kozjaku kroz sve sezone, dok u ranijim danima inkubacija nije bio prisutan (Slika 51). Slično tome, gen AA3_2 bio je prisutan u središnjim fazama inkubacija pululana u Kozjaku tijekom proljeća i zime, dok ga na početku i na kraju inkubacija nije bilo, kao ni u ljetnim inkubacijama (Slika 51). Gen GH2 bio je među najbrojnijima samo na početku proljetne inkubacije pululana, a geni GH33 i CE20 dominirali su na kraju iste (Slika 51A). Gen CE4 bio je identificiran među najbrojnijima u svim inkubacijama, osim u proljeće (Slika 51).

U Crniševu je tijekom proljeća zabilježen veliki broj gena najbrojnijih gena, no u uzorku P_0_PUL_KS njihov je ukupan broj bio nizak i međusobno izjednačen (Slika 52A). Gen GH109 nije bio prisutan na kraju proljetne inkubacije, dok je u ljetnim i zimskim inkubacijama bio identificiran (Slika 52). Slično kao u Kozjaku, gen AA3_2 bio je prisutan u središnjim

fazama zimske inkubacije pululana, dok inače prisutan CE14 nije bio identificiran (Slika 52C). Gen GT83 nije bio identificiran u proljetnoj i zimskoj inkubaciji pululana na 18. dan (Slika 52A i C).



Slika 51. Najbrojniji identificirani geni jezeru Kozjak. Cazymes klase: glikozidne hidrolaze (GH), glikoziltransferaze (GT), polisaharidne liaze (PL), ugljikohidratne esteraze (CE), pomoćne aktivnosti (AA) i module vezanja ugljikohidrata (CBM).



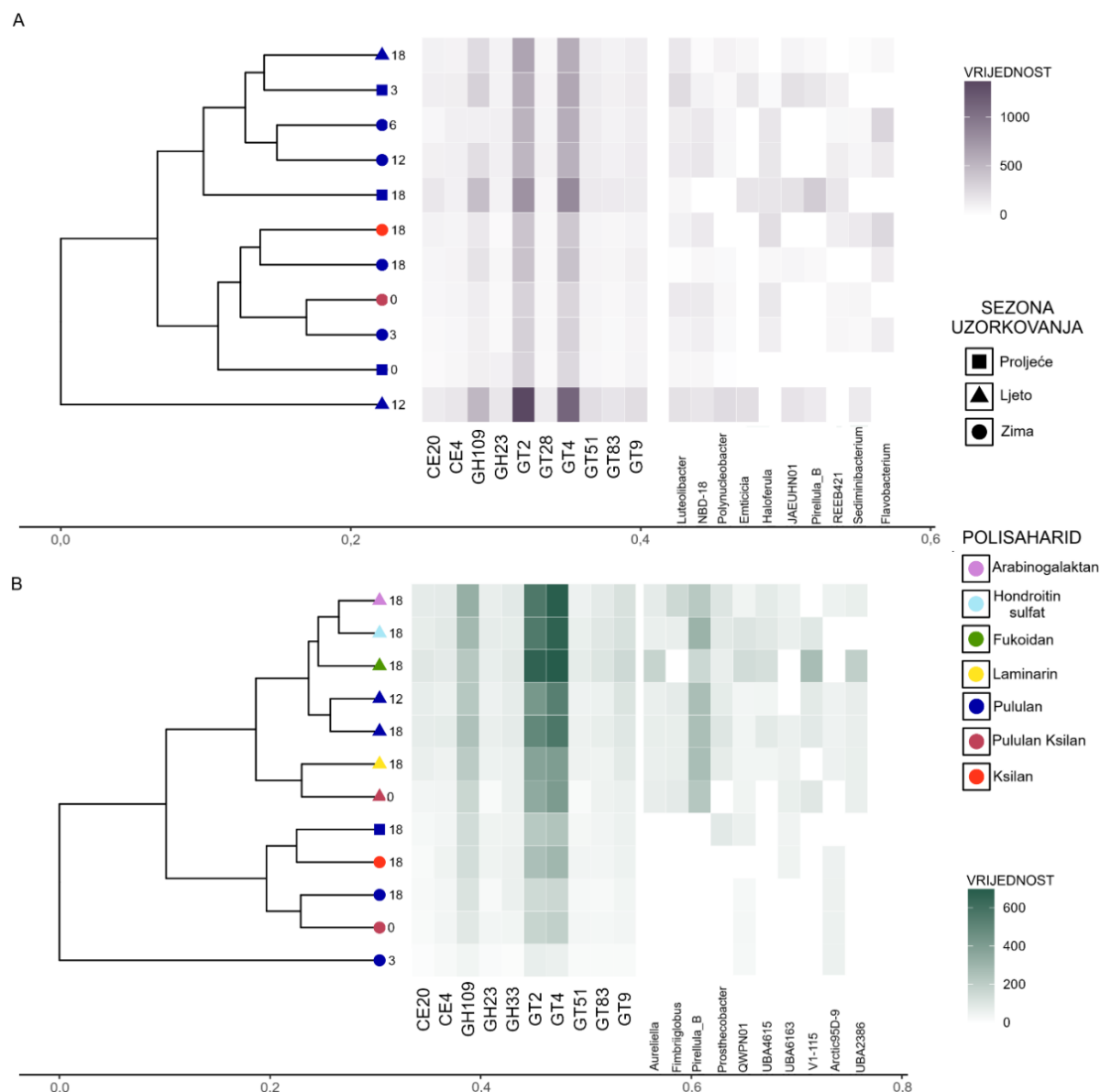
Slika 52. Najbrojniji identificirani geni jezeru Crniševo. Cazymes klase: glikozidne hidrolaze (GH), glikoziltransferaze (GT), polisaharidne liaze (PL), ugljikohidratne esteraze (CE), pomoćne aktivnosti (AA) i module vezanja ugljikohidrata (CBM).

4.3.4. Identifikacija bakterija povezanih s genima za razgradnju polisaharida

Iz mikrobnih zajednica filtrirana su bakterijska koljena za koja je dokazana sebična aktivnost, odnosno razgradnja polisaharida, u drugoj fazi istraživanja. Stoga su u Kozjaku izdvojena koljena Bacteroidota, Plactomycetota i Verrucomicrobiota, te razred Gammaproteobacteria. U Crniševu izdvojena su koljena Plactomycetota i Verrucomicrobiota, te razred Gammaproteobacteria. S ciljem precizne identifikacije CAZy gena u metagenomskim podacima zastupljenost gena istraživana je iz dbcan rezultata. Za najzastupljenije rodove unutar navedenih koljena i razreda istraženo je koje gene nose, a da su isto tako bili najzastupljeniji.

UPGMA stablo u Kozjaku nije razlučilo jasnu sličnost između sadržaja CAZy gena iste sezone, dana inkubacije ili polisaharida (Slika 53A). Rezultat UPGMA jasno je odvojio tri grane gena unutar uzoraka, a prema najzastupljenijim genima vidljivo je da su u grani uzorka LJ_12_PUL dominirali GT2 i GT4, koje nose *Luteolibacter*, *Emticicia* i *Polynucleobacter* (Slika 53A). Navedeni geni bili su manje zastupljeni u grani uzoraka pululana i ksilana, a više u grani gdje su bili samo uzorci pululana (Slika 53A). Slično tome, gen GH109 bio je brojniji u grupi uzoraka s pululanom, a manje prisutan u grupi uzoraka s pululanom i ksilanom, iako je u usporedbi s ostalim genima bio među brojnijima (Slika 53A).

U Crniševu na UPGMA stablu vidljive su jasne dvije grane uzoraka na temelju CAZy gena, jedna za ljetne uzorke, a druga za proljetne i zimske uzorke (Slika 53B). Ovdje se također jedan uzorak (Z_3_PUL) izdvajao iz navedenih grana i izdvojen je kao posebna grana (Slika 53B). Među ljetnim uzorcima dominirali su geni GT2 i GT4 uz manje zastupljeni GH109, a u proljetnim i zimskim uzorcima njihova brojnost bila je puno manja i nije bilo jasne dominacije (Slika 53B). Također, među identificiranim zajednicama u ljetnim uzorcima dominirao je rod *Pirellula_B* (Slika 53B), dok ga u proljetnim i zimskim uzorcima nije bilo, a više je prevladavao rod *Arctic95D-9* (Slika 53B).

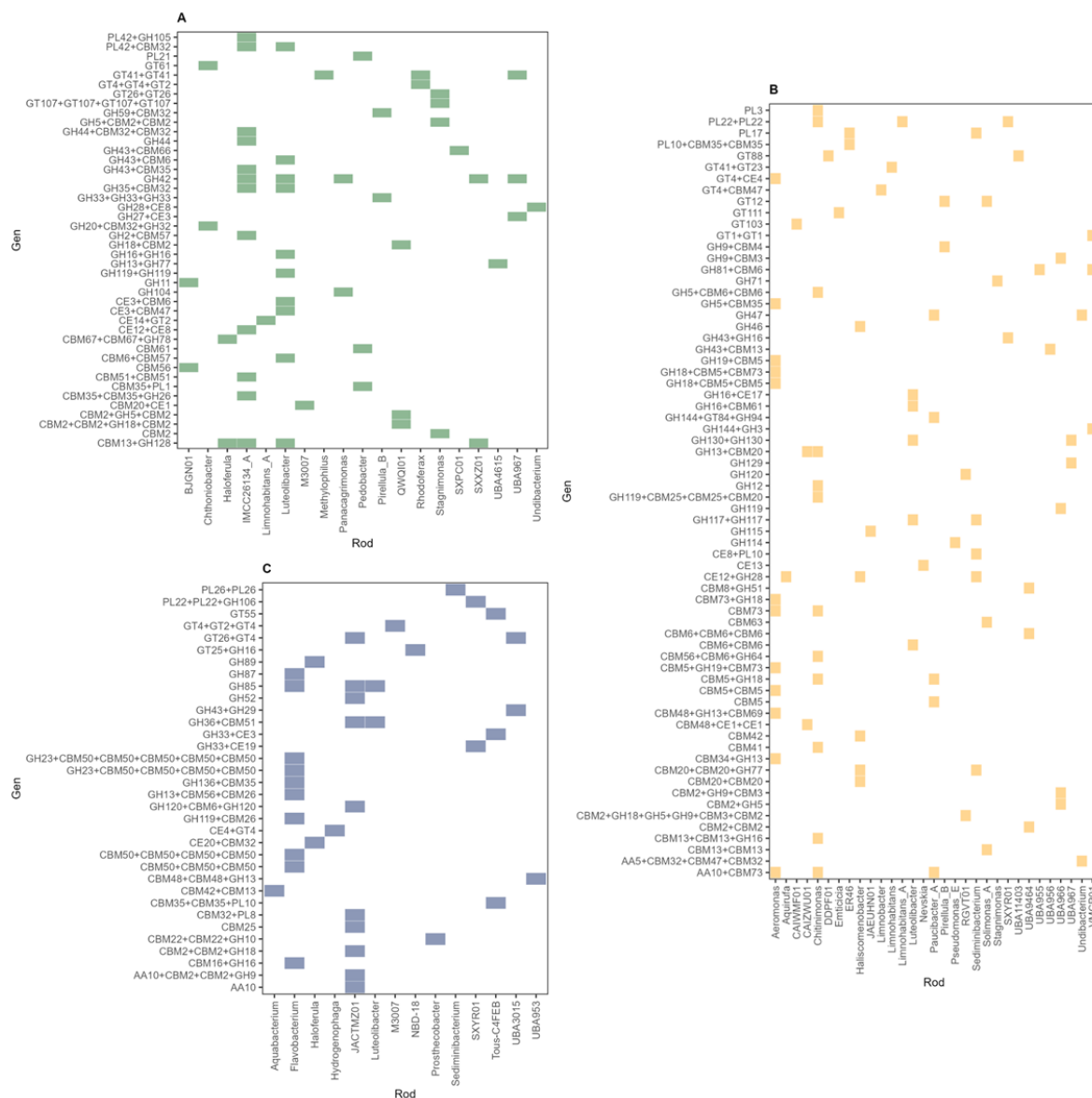


Slika 53. Filogenetsko stablo UPGMA s označenim uzorcima dana inkubacija, sezonskim varijacijama označenih simbolom i dodanog polisaharida označenog bojom, uz mape distribucije najbrojnijih gena identificiranih dbcan analizom i bakterijskih rodova koji ih nose u jezerima Kozjak (A) i Crniševo (B).

U pojedinačnim jezerima istraženi su jedinstveni geni prema različitim sezonama uzorkovanja (Slika 54 i 56).

U jezeru Kozjak najviše jedinstvenih gena identificirano je u ljetnim inkubacijama, a najmanje u zimskim inkubacijama (Slika 54). U proljetnim inkubacijama najviše jedinstvenih gena imali su rodovi *IMCC26134_A* i *Luteolibacter* (Slika 54A). U ljetnim inkubacijama

najviše jedinstvenih gena imali su rodovi *Aeromonas* i *Chitinimonas* (Slika 54B), a u zimskim inkubacijama rodovi *Flavobacterium* i *JACTMZ01* (Slika 54C).

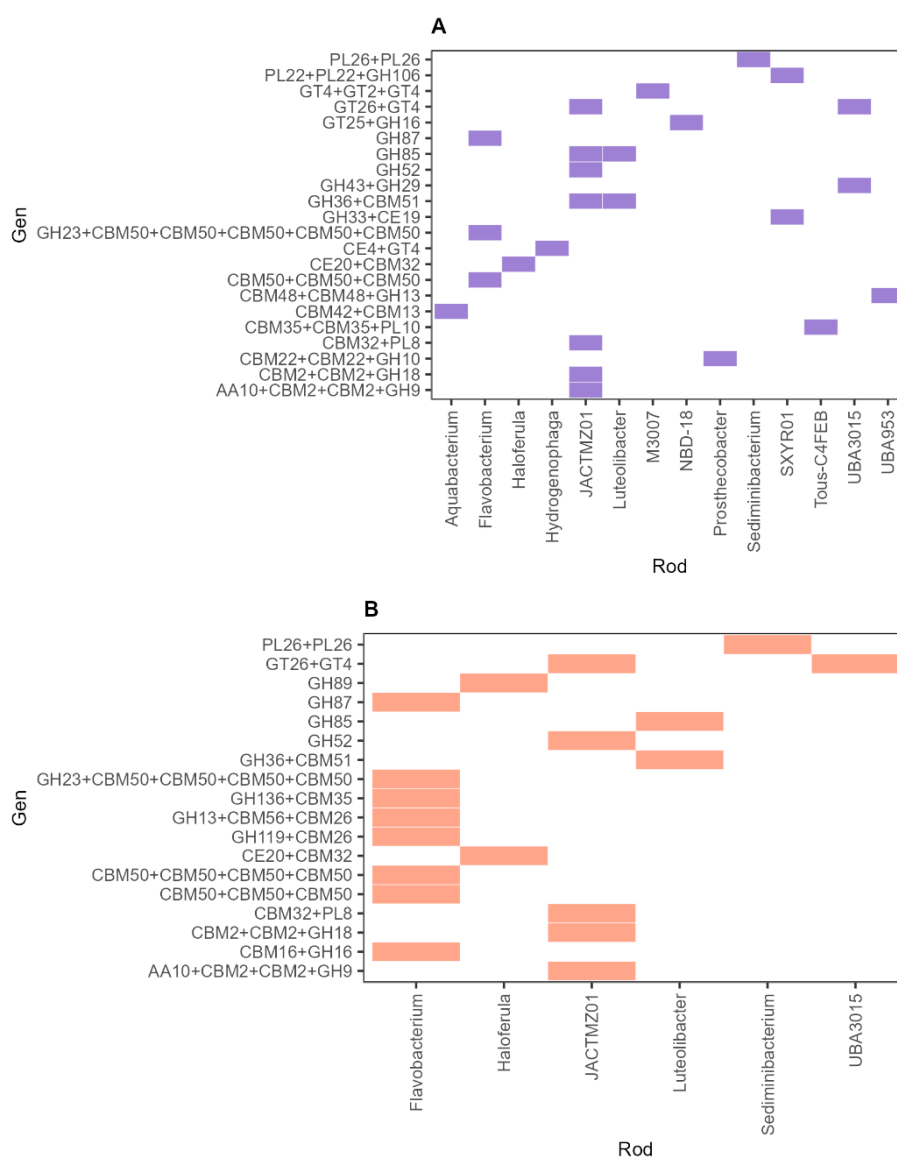


Slika 54. Distribucija jedinstvenih gena po bakterijskim rodovima u jezeru Kozjak u proljeće (A), ljeto (B) i zimu (C).

U zimskoj inkubaciji s pululanom identificirano je 22 jedinstvenih gena, od kojih najviše nosi rod *JACTMZ01*, a specifično gene GH36+CBM51 i GH85 (Slika 55A). *Aquabacterium* nosio je gen CBM42+CBM13, *Hydrogenophaga* gen CE4+GT4, M3007 gen GT4+GT2+GT4,

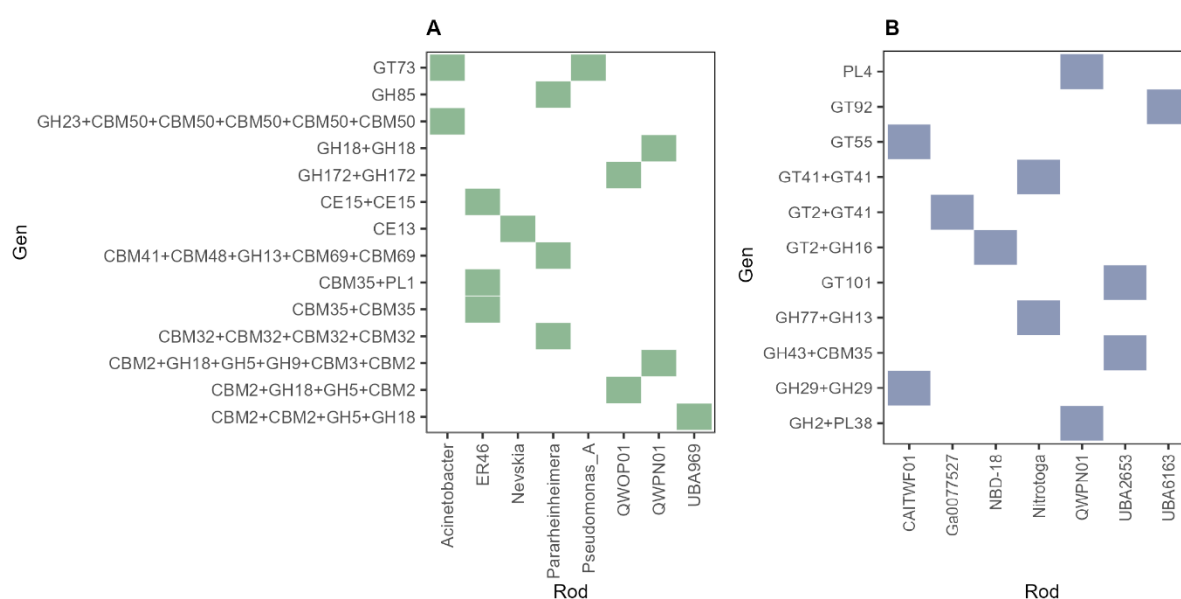
NBD-18 gen GT25+GH16, *Prostheobacter* gen CBM22+CBM22+GH10, *SXYR01* gene GH33+CE19 i PL22+PL22+GH106, *Tous-C4FEB* CBM35+CBM35+PL10 i *UBA953* CBM48+CBM48+GH13 identificirani su isključivo u inkubaciji s pululanom kao nositelji CAZy gena (Slika 55A).

U inkubaciji s ksilanom identificirano je 18 jedinstvenih gena, a najviše ih je nosio rod *Flavobacterium* i to gene CBM16+GH16, GH119+CBM26, GH13+CBM56+CBM26 i GH136+CBM35 (Slika 55B). Ostale jedinstvene gene GH89 i GT26+GT4 nosili su rodovi *Haloferula*, *JACTMZ01* i *UBA3015*.



Slika 55. Distribucija jedinstvenih gena po bakterijskim rodovima u Kozjak u zimskim inkubacijama s pululanom (A) i ksilanom (B).

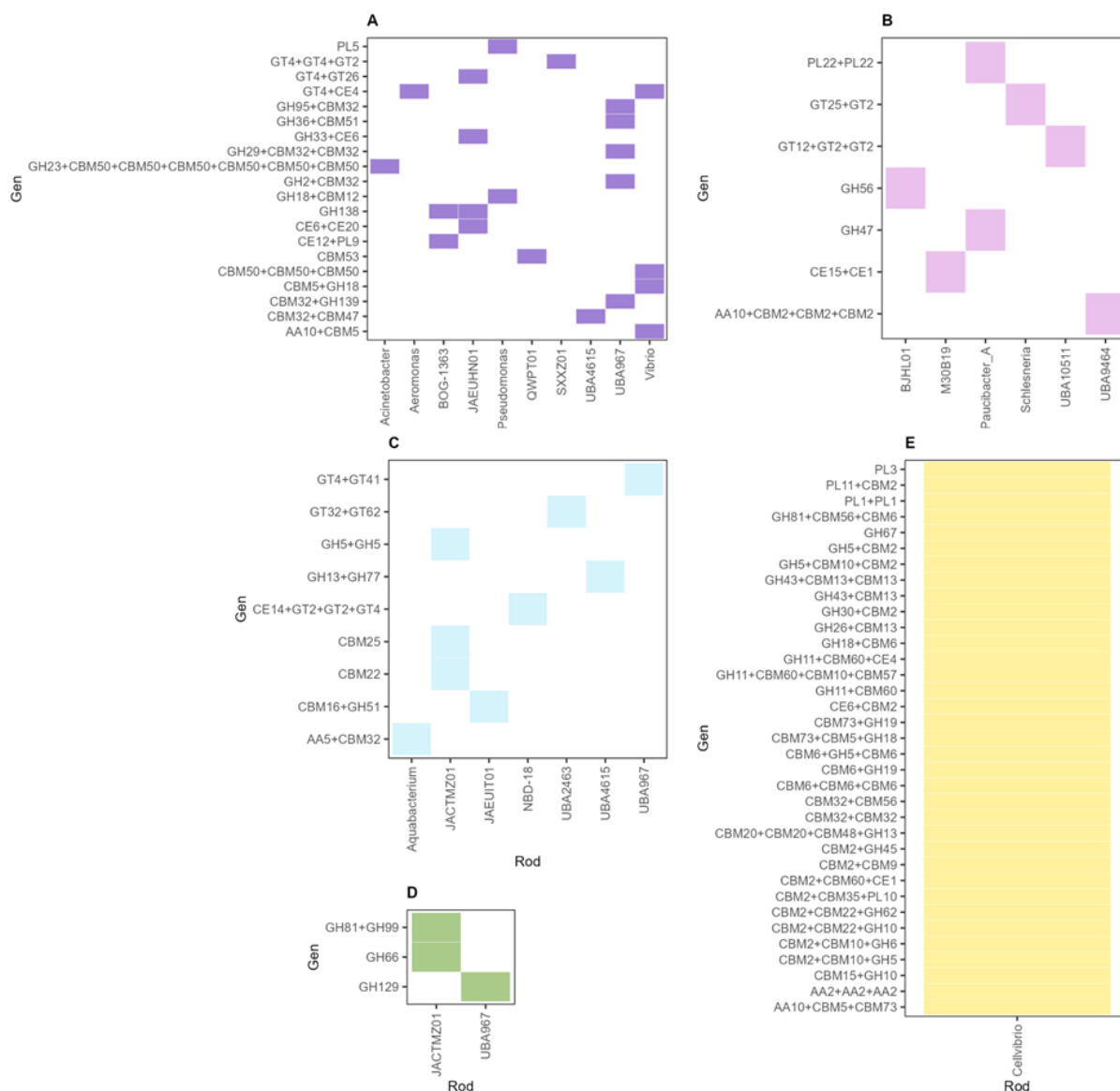
U jezeru Crniševo najviše jedinstvenih gena identificirano je u ljetnim inkubacijama, a najmanje u zimskim inkubacijama (Slika 56). U proljetnim i zimskim inkubacijama svi rodovi imali su podjednak broj jedinstvenih gena (Slika 56A i B). U ljetnim inkubacijama najviše jedinstvenih gena imao je rod *Cellvibrio*, a sveukupno je kao jedinstveni gen identificirano 172 gena (Dodatna slika 15).



Slika 56. Distribucija jedinstvenih gena po bakterijskim rodovima u jezeru Crniševo u proljeće (A) i zimu (B).

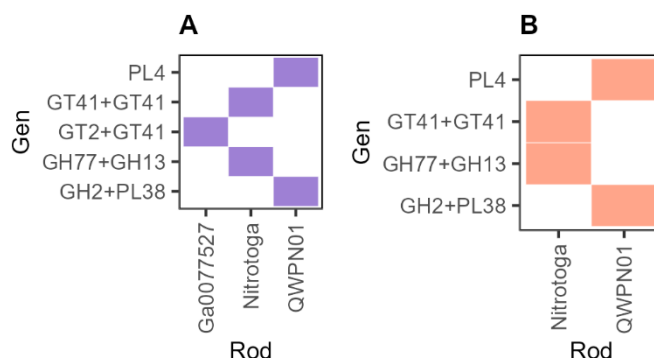
Ljetne inkubacije iz Crniševa imale su različitu brojnost identificiranih jedinstvenih gena prema polisaharidu (Slika 57). U pululan inkubaciji najviše jedinstvenih gena nosili su rodovi *JAEUHN01*, *UBA967* i *Vibrio*, specifično gene CE6+CE20, GH138, GH33+CE6, GT4+GT25, te CBM32+GH129, GH2+CBM32, GH23+CBM32+CBM32, GH36+CBM51, GH95+CBM32 i na kraju AA10+CBM5, CBM5+GH18, CBM50+CBM50+CBM50 i GT4+CE4 (Slika 57A). U arabinogalaktan inkubaciji identificirano je 7 jedinstvenih gena (AA10+CBM2+CBM2+CBM2, CE15+CE1, GH47, GH56, GT12+GT2+GT2, GT25+GT2 i PL22+PL22), a svaki rod (*BJHL01*, *M30B19*, *Schlesneria*, *UBA10511*, *UBA9464*) je nosio jedan gen osim *Paucibacter_A*, koji je nosio 2 gena (Slika 57B). Devet identificiranih gena (AA5+CBM32, CBM16+GH51, CBM22, CBM25, CE14+GT2+GT2+GT4, GH13+GH77, GH5+GH15, GT32+GT62, GT4+GT41) u hondoritin sulfat inkubaciji nosilo je 7 rodova

(*Aquabacterium*, *JAEUT01*, *NBD-18*, *UBA2463*, *UBA4615*, *UBA967*), a najviše *JACTMZ01* (Slika 57C). U fukoidan inkubaciji tri identificirana gena (GH129, GH66, GH81+GH99) nosila su 2 roda, *UBA967* i *JACTMZ01* (Slika 57D). Rod *Cellvibrio* bio je jedini rod koji nosi ukupno 34 jedinstvenih gena u laminarin inkubaciji (Slika 57E).



Slika 57. Distribucija jedinstvenih gena po bakterijskim rodovima u jezeru Crniševo u ljetnoj inkubaciji pululana (A), arabinogalaktana (B), hondroitin sulfata (C), fukoidana (D) i laminarina (E).

U Crniševu u zimskim inkubacijama na 0. dan analizirani su oba polisaharida, pululan i ksilan, stoga ne iznenađuje da su između pululana i ksilana zajednički geni GH2+PL38, GH77+GH13, GT41+GT41 i PL4, koje nose geni *Nitrotoga* i *QWPN01* (Slika 58). Pululan je imao jedinstveni gen GT2+GT41 koji je nosio *Ga0077527* (Slika 58A):



Slika 58. Distribucija jedinstvenih gena po bakterijskim rodovima u Crniševu u zimskim inkubacijama s pululanom (A) i ksilanom (B).

4.3.5. Metagenomski uvid u bakterijsku raznolikost slatkovodnih jezerskih ekosustava

Kompozicija bakterijskih zajednica u smislu brojnosti i alfa raznolikosti imala je slične trendove u istraživanjima cjelokupne metagenomske zajednice kao i u amplikon analizi u tijekom druge faze istraživanja. Mezotrofno jezero Crniševo imalo je veću brojnost i raznolikost mikrobnih zajednica [199], dok je u periodu između dva cvjetanja fitoplanktona, oligotrofno jezero Kozjak imalo veću brojnost, ali manju raznolikost (Slika 44), što ukazuje na dominaciju određenih bakterija. Sastav bakterijske zajednice razlikovao se u prostorno-sezonskom kontekstu, kao i tijekom vremena, u ovisnostima o danima inkubacije. U analizi cjelokupne bakterijske zajednice dokazan je utjecaj dodanih polisaharida na sastav, dok u amplikon sekvenciranju ta razlika nije bila primjećena (Slika 34). Ovaj rezultat nije neočekivan s obzirom na poznatu pristranost PCR amplifikacije prema određenim bakterijskim skupinama. Za razliku od amplikon sekvenciranja, metagenomska analiza ne koristi ciljanu amplifikaciju i pruža reprezentativniji uvid u sastav bakterijskih zajednica [225].

Iako su utjecaj sezone, vremena inkubacije i dodanih polisaharida bili statistički značajni, njegova snaga bila je niska, što ukazuje na to da promjene u sastavu bakterijskih zajednica nisu drastične. Međutim, iako su početni učinci blagi, njihov kumulativni efekt tijekom vremena

može uzrokovati značajne ekološke promjene. Dugoročno, to može utjecati na sastav mikrobioma, metaboličke procese i stabilnost ekosustava.

Oligotrofnim jezerom Kozjak dominirale su bakterije koljena *Proteobacteria* i *Verrucomicrobiota* (Slika 46A), koje su karakteristične za oligotrofna jezera [19], krške vode [221] i jezera umjerene klime. Uz navedena koljena, jezerom Crniševo vidljiva je i dominacija *Plactomycetota*, posebno tijekom ljeta (Slika 46B). *Plactomycetota* su povezane s drugim eukariotskim organizmima, a cvjetanje dijatomeja i cijanobakterija pozitivno utječe na njihovu brojnost jer im one služe kao izvor hranjivih tvari [226]. *Actinobacteriota* i *Bacteroidota*, koje su ključne za kruženje hranjivih tvari, razgradnju organskog ugljika te procese nitrifikacije i amonifikacije, bile su značajnije zastupljenije u sezonama (Slika 46) s povećanim udjelom hranjivih tvari (Slika 30; Dodatna tablica 4).

Unutar jezera Kozjak sveprisutan je bio rod *Luteolibacter* (*Verrucomicrobiota*) koji je prethodno izoliran iz različitih izvora uključujući crvene alge, tlo i uzorke mulja [227], a može koristiti monosaharide i sudjelovati u kruženju ugljika [228]. Također, rod *NBD-18* (*Proteobacteria*) poznat po genima za središnji metabolizam ugljikohidrata [229], te rod *Emticicia* (*Bacteroidota*), koji koristi glukozu za rast [230], bili su sveprisutni. Neki rodovi pokazali su sezonsku varijabilnost. Rodovi *Sphingomonas* (*Proteobacteria*) i *Flavobacterium* (*Bacteroidota*), tipični predstavnici mikrobnih zajednica tla [231], bili su predstavnici proljetne i zimske zajednice (Slika 47A). Rod *Polynucleobacter* bio je predstavnik ljetne zajednice (Slika 47A) jer za rast koristi spojeve nastale razgradnjom fotokemijski otopljene organske tvari [232].

U jezeru Crniševo također su bile izražene sezonske razlike u zastupljenosti nekih rodova. Rod *Fonsibacter*, s funkcijom iskorištavanja organskih spojeva [233] bio je brojniji u proljeće, dok je rod *Pirellula*, koji sudjeluje u razgradnji organske tvari, bio predstavnik ljetne zajednice (Slika 47B) [234]. Jezero Crniševo ima dotok morske vode kroz porozni krš [138] stoga ne začuđuje prepoznavanje rodova *BACL27* i *PHOS-HE28*, povezanih s morskim okolišem [235,236], kao predstavnika proljetnih i zimskih zajednica (Slika 47B).

4.3.6. Sezonske i prostorne varijacije gena koji kodiraju CAZymes u oligotrofnom i mezotrofnom jezeru

Usporedbom broja gena koji kodiraju CAZymes vidljiva je veća brojnost u oligotrofnom jezeru Kozjak (Slika 48). Analizirani uzorci imali su najvišu aktivnost sebičnog mehanizma razgradnje polisaharida koji je više prisutan u oligotrofnim područjima, kao što su oligotrofni

morski vrtlozi [13] i u duboko more [10,192], stoga je i očekivana viša prisutnost gena za razgradnju polisaharida. Općenito, najviše gena koji kodiraju CAZymes identificirano je tijekom ljetnih inkubacija u oba jezera (Slika 48), razdoblje fitoplanktonskog cvata, odnosno visoke biološke produkcije. U slatkovodnim ekosustavima većina mikrobnih enzima je inducibilna, što znači da se sintetiziraju u niskim bazalnim količinama u odsutnosti supstrata, dok prisutnost supstrata uzrokuje značajan porast njihove proizvodnje [237]. Nadalje, u sklopu mehanizma *quorum sensing* (mehanizam osjeta kvoruma), bakterije mogu proizvoditi male količine inducibilnih enzima čak i bez prisutnog supstrata, kao spekulativni senzorski mehanizam za njegovo otkrivanje ili za depolimerizaciju kompleksnih supstrata, čime se omogućuje difuzija monomera i oligomera u stanicu te posljedična indukcija intenzivnije sinteze enzima [238]. Ova strategija objašnjava sezonske fluktuacije broja identificiranih gena koji kodiraju CAZymes, najmanji broj zabilježen je zimi, prije fitoplanktonskog cvata, dok je najveći broj prisutan ljeti, tijekom aktivnog cvata (Slika 48). U proljeće, u razdoblju između dva cvata, vrijednosti su bile niže nego ljeti i više nego zimi. Također, promatrajući vremenske periode inkubacija, povećanje broja identificiranih gena uočeno je u proljeće i zimi tijekom trajanja inkubacija, što upućuje na bakterijsku senzibilnost na prisutnost supstrata i posljedično povećanu aktivaciju sinteze enzima (Slika 48).

Sastav identificiranih gena koji kodiraju CAZymes se sukladno navedenom također sezonski razlikovao, a u jezeru Crniševo tijekom ljetnih inkubacija analiza je potvrdila razliku između polisaharida (Slika 49). Najveći broj identificiranih gena pripadao je klasi GT, klasi uključenoj u biosintezu složenih ugljikohidrata [239]. Najbrojniji su bili GT2 i GT4, dvije najveće porodice u CAZy bazi podataka, koje čine oko polovicu ukupnog broja GT-ova [240], a kataliziraju širok raspon reakcija s različitim donorima i receptorima šećera [241], poput sinteze celuloze, hitina, hijaluronske kiseline i saharoze. Drugi identificirani geni pripadaju klasi GH koja cijepa glikozidne veze u polisaharidima i oligosaharidima i otpušta monomerne produkte. Sveprisutni GH23 obuhvaća enzime lizozimske aktivnosti, za razgradnju peptidoglikana [239], GH109 enzime za razgradnju glikoproteina [242], a GH77 enzime za razgradnju biljnih ostataka [242]. Gen GH3 posjeduje enzime za razgradnju celulozne biomase [239], i stoga je bio među najbrojnijima u jezeru Kozjak, koji je pod većim pritiskom okolnog tla [138], dok enzimi gena CE4 uklanjaju etilne skupine u hitinu [243]. Također, gen AA3 povezan je s celobioznom dehidrogenazom [244].

4.3.7. Struktura i povezanost CAZy gena s polisaharidima i bakterijskim rodovima

U oligotrofnom jezeru Kozjak nije bilo jasnog grupiranja identificiranih gena po sezoni, danu inkubacije ili dodanom polisaharidu (Slika 53A) što može ukazivati na veću funkcionalnu plastičnost mikrobne zajednice, odnosno da iste funkcionalne gene (CAZymes) nose različite bakterije. Oligotrofni ekosustavi često sadrže bakterije sa sustavima unosa polisaharida za široki spektar supstrata i usmjerene genome [245]. Suprotno tome, u mezotrofnom jezeru Crniševu, s više hranjivih tvari, uzorci su se jasno sezonski grupirali prema identificiranim genima (Slika 53B), što ukazuje na funkcionalni odgovor povezaniji s okolišnim uvjetima. Ljetni uzorci pokazali su jasnu dominaciju GT2,GT4 i GH109, što je u skladu s intenzivnom biosintezom i razgradnjom složenih ugljikohidrata tijekom produktivnijih sezona [242,246], a rod *Pirellula*, ljetni indikator, nositelj je tih gena (Slika 53B). Proljetni i zimski uzorci nisu pokazali toliko jasnu dominaciju gena, ni bakterijskih rodova, što ukazuje na nižu aktivnost specifičnih degradacijskih puteva (Slika 53B).

Određeni rodovi prepoznati su kao nositelji CAZy gena specifično identificiranih u pojedinim inkubacijama i time je vidljiva funkcionalna prostorno-sezonska selektivnost mikrobnih zajednica ovisno o prisutnom polisaharidu.

U zimskoj inkubaciji jezera Kozjak s pululanom rodovi koljena Verrucomicrobiota nosili su najviše jedinstvenih gena za razgradnju (Slika 55A). Rodovi *Prostheco bacter*, *Tous-C4FEB* i *UBA953* uz *Luteolibacter* nositelji su kombinacija gena za glikozidnu hidrolizu uz višestruke CBM domene koje ukazuju na visoku afinitetnost za vezanje kompleksnih polisaharida [247]. Također, rod *Aquabacterium* (Gammaproteobacteria) nosio je sličnu kombinaciju, dok su rodovi koljena Bacteroidota (*M3007* i *SXYR01*) nosili gene GH i CE i potencijalno razgrađivali pululan vanjskom hidrolizom. Rod *JACTMZ01* (Verrucomicrobiota) nositelj najviše specifičnih gena koji mogu ukazivati na razgradnju pululana svim opisanim mehanizmima. Specifično, CAZy porodice GH36 i GH85 dokazano razgrađuju polisaharide prisutne u biljnim ostacima [248] ili iz stanične stijenke [247] zbog čega su prisutni u jezeru Kozjak, koji je pod većim utjecajem okolnog tla [138]. Rod *Flavobacterium* iz koljena Bacteroidota ističe se kao nositelj najvećeg broja jedinstvenih gena tijekom inkubacije s ksilanom, pri čemu se posebno izdvaja prisutnost enzima iz obitelji GH16, ranije povezanih s razgradnjom ksilana [249]. Iako su bakterije iz koljena Bacteroidota bile aktivne tijekom razgradnje, nisu pokazivale sebičnu aktivnost prema ksilanu (Slika 38A), što upućuje na to da u razgradnji sudjeluju putem drugih mehanizama vanjske hidrolize. U Crniševu su u zimskim inkubacijama pululana nositelji

jedinstvenih gena bili rodovi koljena Gammaproteobacteria (*Nitrotoga*, *Ga0077527*) i Planctomycetota (*QWPN01*), a posebno treba istaknuti gene GH2 i GH13 (Slika 58) nositelje pululanaza [250].

Ljetne inkubacije iz Crniševa imale su različitu brojnost identificiranih jedinstvenih gena prema polisaharidu (Slika 57). Arabinogalaktan su specifično razgrađivali rodovi *M30B19* (Planctomycetota) i *Paucibacter* (Gammaproteobacteria) kao nositelji jedinstvenih gena CE15+CE1, koji uklanjanju esterske modifikacije [251], čime olakšavaju pristup GH enzimima i GH47, koji može sudjelovati u razgradnji arabinogalaktan kao dijela glikoproteina [252]. U hondroitin sulfat inkubaciji od jedinstvenih gena ističe se kombinacija AA5+CBM32, koji veže N-acetilgalaktozamin [253], što je dio hondroitin sulfata, a nositelj je rod *Aquabacterium* (Gammaproteobacteria). Rod *JACTMZ01* (Verrucomicrobiota) sudjelovao je u razgradnji fukoidana kao nositelj gena GH129, sudionika u razgradnji sulfatiranih polisaharida iz algi [254], a rod *Cellvibrio* (Gammaproteobacteria) je od prije prepoznat kao sudionik u razgradnji laminarina [255].

§ 5. ZAKLJUČAK

Ova doktorska disertacija produbljuje razumijevanje mikrobnih procesa u složenim slatkovodnim ekosustavima. Pruža detaljan uvid u ulogu mikrobnih zajednica u ciklusu ugljika, s posebnim naglaskom na razgradnju polisaharida, ključnih komponenti organske tvari u vodama. Rezultatima prikazanim u sklopu ove disertacije produbljuje se razumijevanje biokemijskih procesa razgradnje polisaharida u slatkovodnim ekosustavima.

Korištenjem suvremenih molekularnih alata kroz tri istraživačke faze, utvrđene su prostorne i vremenske varijacije mikrobnih zajednica između različitih tipova vodotoka unutar slivnog područja slatkovodno povezanog ekosustava. Također, istražena je prisutnost i varijabilnost sebičnog mehanizma razgradnje polisaharida kod bakterija te su analizom cjelokupne mikrobne zajednice identificirane bakterije odgovorne za razgradnju polisaharida različitim mehanizmom. Kombinacija kultivacijskih i suvremenih metoda omogućila je sveobuhvatnu analizu mikrobnih zajednica i njihovih funkcionalnih sposobnosti. Ovim pristupom pruženi su novi uvidi u bakterijske strategije iskorištavanja polisaharida te njihovu ulogu u kruženju hranjivih tvari u slatkovodnim ekosustavima.

U prvoj fazi istraživanja definirane su ekološke i mikrobne razlike između različitih tipova potoka i sezona uzorkovanja unutar povezanog slatkovodnog ekosustava. Mikrobne zajednice u povezanom slatkovodnom ekosustavu razlikovale su se među vrstama potoka, a u pritocima je zabilježen jači utjecaj tla. U proljeće i zimi na formiranje mikrobne zajednice veći je utjecaj imao učinak mase, dok je ljeti to bilo sortiranje vrsta i okolišni odabir. Na sastavljanje prokariotske zajednice utjecali su deterministički procesi u cijelom sustavu i u svim godišnjim dobima, dok je manji utjecaj stohastičkih procesa vidljiv zimi. Sastavljanju zajednice gljiva doprinijeli su stohastički procesi. Unatoč manjim promjenama u zajednicama kroz godišnja doba, utvrđivanjem temeljnog središnjeg mikrobioma povezanog slatkovodnog toka dokazana je stabilnost mikrobnih zajednica Plitvičkih jezera. Ipak, zbog sve većeg antropogenog utjecaja i neizbježnih klimatskih promjena, potrebno je detaljnije istraživanje i praćenje.

U drugoj fazi istraživanja otkrivena je prisutnost sebičnog mehanizma unosa i iskorištavanja polisaharida u slatkovodnim ekosustavima. Sebična aktivnost varirala je ovisno o trofičkom stanju jezera, s time da je jezero s višim trofičkim stanjem (Crniševo) pokazalo veću mikrobnu

raznolikost i povećan sebični unos. Dokazan je sezonski utjecaj na bakterijske zajednice i sebičnu aktivnost unutar jezera, pri čemu je sebični unos najrašireniji među polisaharidima tijekom cvjetanja fitoplanktona (mezotrofno jezero Crniševu) ili intenzivnog kopnenog utjecaja (oligotrofno jezero Kozjak). Utvrđeno je da su bakterije iz roda *Bacteroidota*, *Planctomycetota* i *Verrucomicrobiota* i razreda *Gammaproteobacteria* povezane sa sebičnom aktivnošću. Ove su bakterije pokazale različite stupnjeve sebične aktivnosti u različitim jezerima i godišnjim dobima, što ukazuje na složenu međuigru između strukture mikrobne zajednice i sebičnog ponašanja. Dokazom postojanja sebičnog mehanizma u slatkovodnim ekosustavima naglašava se važnost razmatranja mehanizama razgradnje u kruženju nutrijenata. Međutim, vidljiv odgovor mnogih bakterija na dodane polisaharide bez pokazivanja sebičnog mehanizma ukazuje na alternativne, izvanstanične mehanizme za razgradnju polisaharida kod bakterija.

Analiza metagenomskih podataka u trećoj fazi istraživanja pokazala je različit sastav bakterijskih zajednica i gena između jezera, sa značajnim razlikama između sezona i različitih uvjeta inkubacija (polisaharidi i trajanje inkubacije). Ove razlike mogu ukazivati na specifične ekološke čimbenike koji utječu na bakterijsku raznolikost i enzimske aktivnosti u različitim uvjetima. Kozjak je pokazao veću brojnost gena koji kodiraju CAZymes, s izraženom funkcionalnom fleksibilnošću, dok je u Crniševu zabilježeno sezonsko grupiranje gena i specifičnih rodova, osobito tijekom ljetne inkubacije. Dodani polisaharidi u inkubacije selektivno su poticali rast bakterija nositelja specifičnih gena za njihovu razgradnju, što ukazuje na visok stupanj funkcionalne prilagodbe zajednica. U razgradnji pululana u Kozjaku ključni su rodovi *Prostheco bacter*, *UBA953*, *Luteolibacter* i *JACTMZ01*, dok su u Crniševu to *Nitrotoga* i *QWPN01*. Kod razgradnje ksilana dominira *Flavobacterium*, arabinogalaktana *M30B19* i *Paucibacter*, hondroitin sulfata *Aquabacterium*, fukoidana *JACTMZ01*, a laminarina *Cellvibrio*. Analiza metagenoma otkrila je obrasce koji nisu bili vidljivi amplikon analizom, naglašavajući važnost okolišnih čimbenika i dostupnosti supstrata u oblikovanju mikrobne zajednice i gena.

Ovo istraživanje doprinosi boljem razumijevanju ekološke dinamike u vodenim ekosustavima i otvara mogućnosti primjene specifičnih enzima u biotehnološkim i industrijskim procesima razgradnje polisaharida.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ (prema potrebi)

AA	<i>Auxiliary activities</i> – Pomoćne aktivnosti
AOR	<i>Abundance-occupancy relationship</i> – Odnos brojnosti i naseljenosti
ANOSIM	<i>Analysis of similarity</i> – Analiza sličnosti
ANOVA	Test analize varijance
ASV	<i>Amplicon sequence variant</i>
β MNTD	<i>β-mean nearest taxon indeks</i> – Indeksi β -srednjeg najbližeg taksona
β NTI	<i>β-nearest taxon index</i> – β -najbliži takson
CAZymes	<i>Carbohydrate-active enzymes</i> – Enzimi koji aktivno djeluju na ugljikohidrate
CBM	<i>Carbohydrate-binding modules</i> – Moduli vezanja ugljikohidrata
CCD	<i>Cooled charge-coupled device camera</i> – Hlađena kamera s naelektrizirano spregnutim uređajima
CE	<i>Carbohydrate esterases</i> – Ugljikohidratne esteraze
DDR	<i>Distance decay relationship</i> – Odnos propadanja udaljenosti
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DOC	<i>Dissolved organic carbon</i> – Otopljeni organski ugljik
DOM	<i>Dissolved organic matter</i> – Otopljene organske tvari
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> – Razvrstavanje stanica aktivirano fluorescencijom
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> – Fluorescencijska in situ hibridizacija
FLAPS	<i>Fluorescently-labeled polysaccharides</i> – Fluorescentno obilježeni polisaharidi
FLA	<i>Fluoresceinamine</i> – Fluoresceinamin
GH	<i>Glycoside hydrolases</i> – Glikozidne hidrolaze
GT	<i>Glycosyltransferases</i> – Glikoziltransferaze
GTDB	<i>Genome Taxonomy Database</i>
HMMs	<i>Hidden Markov Models</i>
HMW	<i>High molecular weight</i> – Spojevi visoke molekulske mase
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer region</i>
LMW	<i>Low molecular weight</i> – Spojevi niske molekulske mase

LPMO	<i>Lytic polysaccharide monooxygenases</i> – Litičke polisaharidne monooksigenaze
MAGs	<i>Metagenome Assembled Genomes</i>
NMDS	<i>Non-metric multi-dimensional scaling plots</i> – Grafikoni nemetričkog višedimenzionalnog skaliranja
PC	<i>Polycarbonate</i> – Polikarbonat
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> – Analiza glavnih komponenti
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Lančana reakcija polimerazom
PCoA	<i>Principal Coordinate Analysis</i> – Analiza glavnih koordinata
PERMANOVA	<i>Permutational Multivariate Analysis of Variance</i> – Permutacijska multivarijatna analiza varijance
PL	<i>Polysaccharide lyases</i> – Polisaharidne liaze
RC	<i>Raup-Crick</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
SILVA	SILVA baza podataka
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i> – Metoda neponderiranih parnih grupa s aritmetičkom sredinom

§ 7. LITERATURNI IZVORI

- [1] L. Gu, B. Huang, F. Han, Z. Xu, D. Ren, H. He, X. Pan i D.D. Dionysiou, *J. Hazard Mater* **369** (2019) 40–49.
- [2] M. Ni, S. Li, I. Santos, J. Zhang i J. Luo, *Science of The Total Environment* **704** (2020) 135353.
- [3] J. Piontek, N. Handel, C. De Bodt, J. Harlay, L. Chou i A. Engel, *J. Plankton. Res.* **33** (2011) 1719–1735.
- [4] G.G. Babaniyi, O.V. Olagoke i S.A. Aransiola, *Microbiology for Cleaner Production and Environmental Sustainability*, CRC Press, 2023, str. 277–300.
- [5] A. Levasseur, E. Drula, V. Lombard, P.M. Coutinho i B. Henrissat, *Biotechnol. Biofuels* **6** (2013) 41.
- [6] S.D. Allison, *Ecol. Lett.* **8** (2005) 626–635.
- [7] K.I. Ramin and S.D. Allison, *Front. Microbiol.* **10** (2019).
- [8] G. Reintjes, C. Arnosti, B. Fuchs i R. Amann, *ISME J* **13** (2019) 1119–1132.
- [9] F. Cuskin, E.C. Lowe, M.J. Temple, Y. Zhu, E. A. Cameron, N.A. Pudlo, N.T. Porter, K. Urs, A. J. Thompson, A. Cartmell, A. Rogowski, B.S. Hamilton, R. Chen, T. J. Tolbert, K. Piens, D. Bracke, W. Vervecken, Z. Hakki, Ga. Speciale, J.L. Munōz-Munōz, A. Day, M.J. Peña, R. McLean, M. Douglas, L. Suits, A.B. Boraston, T. Atherly, C.J. Ziemer, S.J. Williams, G.J. Davies, D. W. Abbott, E.C. Martens i H.J. Gilbert, *Nature* **517** (2015) 165–169.
- [10] G. Giljan, S. Brown, C.C. Lloyd, S. Ghobrial, R. Amann i C. Arnosti, *ISME Communications* **3** (2023).
- [11] G. Giljan, C. Arnosti, I. V. Kirstein, R. Amann i B.M. Fuchs, *Environ. Microbiol.* **24** (2022) 2333–2347.
- [12] G. Reintjes, B.M. Fuchs, M. Scharfe, K.H. Wiltshire, R. Amann i C. Arnosti, *Environ. Microbiol.* **22** (2020) 1884–1900.
- [13] G. Reintjes, B.M. Fuchs, R. Amann i C. Arnosti, *Front. Microbiol.* **11** (2020).
- [14] K. Ziervogel, D. Leech i C. Arnosti, *Biogeochemistry* **117** (2014) 143–151.
- [15] M. Stadler i P.A. del Giorgio, *ISME J* **16** (2022) 937–947.
- [16] E.S. Lindström, M.P. Kamst-Van Agterveld i G. Zwart, *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (2005) 8201–8206.

- [17] C. Staley, T. Unno, T.J. Gould, B. Jarvis, J. Phillips, J.B. Cotner i M.J. Sadowsky, *J Appl. Microbiol.* **115** (2013) 1147–1158.
- [18] C.A. Hanson, J.A. Fuhrman, M.C. Horner-Devine i J.B.H. Martiny, *Nat. Rev. Microbiol.* **10** (2012) 497–506.
- [19] R.J. Newton, S.E. Jones, A. Eiler, K.D. McMahon i S. Bertilsson, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75** (2011) 14–49.
- [20] H. Grossart, *Environ. Microbiol. Rep.* **2** (2010) 706–714.
- [21] H. Grossart, J. Jezbera, K. Hornák, K.M.L. Hutalle, U. Buck i K. Šimek, *Environ. Microbiol.* **10** (2008) 635–652.
- [22] A. Hu, M. Choi, A.J. Tanentzap, J. Liu, K.-S. Jang, J.T. Lennon, Y. Liu, J. Soininen, X. Lu, Y. Zhang, J. Shen i J. Wang, *Nat. Commun.* **13** (2022) 3600.
- [23] S. Nandy and A. Kapley, *AQUA — Water Infrastructure, Ecosystems and Society* **73** (2024) 11–33.
- [24] H.-P. Grossart, S. Van den Wyngaert, M. Kagami, C. Wurzbacher, M. Cunliffe i K. Rojas-Jimenez, *Nat. Rev. Microbiol.* **17** (2019) 339–354.
- [25] T. Frenken, E. Alacid, S.A. Berger, E.C. Bourne, M. Gerphagnon, H. Grossart, A.S. Gsell, B.W. Ibelings, M. Kagami, F.C. Küpper, P.M. Letcher, A. Loyau, T. Miki, J.C. Nejtgaard, S. Rasconi, A. Reñé, T. Rohrlack, K. Rojas-Jimenez, D.S. Schmeller, B. Scholz, K. Seto, T. Sime-Ngando, A. Sukenik, D.B. Van de Waal, S. Van den Wyngaert, E. van Donk, J. Wolinska, C. Wurzbacher i R. Agha, *Environ. Microbiol.* **19** (2017) 3802–3822.
- [26] H.-P. Grossart and K. Rojas-Jimenez, *Curr. Opin. Microbiol.* **31** (2016) 140–145.
- [27] C.A. Shearer, E. Descals, B. Kohlmeyer, J. Kohlmeyer, L. Marvanová, D. Padgett, D. Porter, H.A. Raja, J.P. Schmit, H.A. Thorton i H. Voglymayr, *Biodivers. Conserv.* **16** (2007) 49–67.
- [28] W. Christian, K. Janice i G. Hans-Peter, *The Dynamical Processes of Biodiversity - Case Studies of Evolution and Spatial Distribution*, InTech, 2011.
- [29] L. V. Voronin, *Inland. Water Biol.* **7** (2014) 352–356.
- [30] R.A. Rossini, *Austral. Ecol.* **44** (2019) 353–354.
- [31] J. Zhou i D. Ning, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81** (2017).
- [32] J.C. Stegen, X. Lin, J.K. Fredrickson, X. Chen, D.W. Kennedy, C.J. Murray, M.L. Rockhold i A. Konopka, *ISME J* **7** (2013) 2069–2079.
- [33] F. Dini-Andreote, J.C. Stegen, J.D. van Elsas i J.F. Salles, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112** (2015).

- [34] M.A. Leibold i J.M. Chase, *Metacommunity Ecology*, Vol. 59, Princeton University Press, 2018.
- [35] J.M. Chase i J.A. Myers, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366** (2011) 2351–2363.
- [36] C.E. Nelson, S. Sadro i J.M. Melack, *Limnol. Oceanogr.* **54** (2009) 1292–1305.
- [37] F. Caillon, K. Besemer, P. Peduzzi i J. Schelker, *Microb. Ecol.* **82** (2021) 591–601.
- [38] M.L. de Melo, S. Bertilsson, J.H.F. Amaral, P.M. Barbosa, B.R. Forsberg i H. Sarmento, *Freshw. Biol.* **64** (2019) 108–120.
- [39] D.S. Read, H.S. Gweon, M.J. Bowes, L.K. Newbold, D. Field, M.J. Bailey i R.I. Griffiths, *ISME J* **9** (2015) 516–526.
- [40] D. Savio, L. Sinclair, U.Z. Ijaz, J. Parajka, G.H. Reischer, P. Stadler, A.P. Blaschke, G. Blöschl, R.L. Mach, A.K.T. Kirschner, A.H. Farnleitner i A. Eiler, *Environ. Microbiol.* **17** (2015) 4994–5007.
- [41] W.K. Dodds i J.J. Cole, *Aquat. Sci.* **69** (2007) 427–439.
- [42] H.M. Halvorson, K.H. Wyatt i K.A. Kuehn, *Freshw. Biol.* **65** (2020) 1183–1188.
- [43] O. V. Matantseva i S.O. Skarlato, *J. Evol. Biochem. Physiol.* **49** (2013) 377–388.
- [44] A. Buchan, G.R. LeClerc, C.A. Gulvik i J.M. González, *Nat. Rev. Microbiol.* **12** (2014) 686–698.
- [45] R. Benner, *Aquatic Ecosystems*, Elsevier, 2003, str. 121–137.
- [46] X.A. Álvarez-Salgado, M. Nieto-Cid i P.E. Rossel, *Marine Analytical Chemistry*, Springer International Publishing, Cham 2023, str. 39–102.
- [47] A. Nebbioso i A. Piccolo, *Anal. Bioanal. Chem.* **405** (2013) 109–124.
- [48] X. Cui i K.-H. Choo, *Environmental Engineering Research* **19** (2014) 1–8.
- [49] X. Yu, J. Zhang, F. Kong, Y. Li, M. Li, Y. Dong i M. Xi, *Ecol. Indic.* **102** (2019) 528–537.
- [50] I. Ylla, H. Peter, A.M. Román i L.J. Tranvik, *FEMS Microbiol. Ecol.* **85** (2013) 95–103.
- [51] W.K. Dodds i J.J. Cole, *Aquat. Sci.* **69** (2007) 427–439.
- [52] B. Mostajir, C. Amblard, E. Buffan-Dubau, R. De Wit, R. Lensi i T. Sime-Ngando, *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*, Springer Netherlands, Dordrecht 2015, str. 485–509.
- [53] E.M. Thurman, *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Kluwer Academic Publishers, Boston 1985, str. 1–65.

- [54] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, G.J. Gatto i L. Stryer, *Stryer Biochemie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2018.
- [55] R.A. Laine, *Glycobiology* **4** (1994) 759–767.
- [56] C. Arnosti, M. Wietz, T. Brinkhoff, J.-H. Hehemann, D. Probandt, L. Zeugner i R. Amann, *Ann. Rev. Mar. Sci.* **13** (2021) 81–108.
- [57] U. Münster i D. Albrecht, *Dissolved Organic Matter: Analysis of Composition and Function by a Molecular-Biochemical Approach*, 1994, str. 24–62.
- [58] N.O.G. Jørgensen, *Encyclopedia of Inland Waters*, Elsevier, Oxford 2009, str. 727–742.
- [59] Z. Wen, Y. Shang, K. Song, G. Liu, J. Hou, L. Lyu, H. Tao, S. Li, C. He, Q. Shi i D. He, *Water Res.* **224** (2022) 119073.
- [60] H. Xu i L. Guo, *Water Res.* **117** (2017) 115–126.
- [61] Q.-H. Ye, G.-D. Sun, Y.-H. Wang, S. Zhang, Y. Xu, L. Feng, M.J. Simpson, C. He, Q. Shi, L.-P. Li i J.-J. Wang, *Water Res.* **222** (2022) 118884.
- [62] F. Rossi i R. De Philippis, *Life* **5** (2015) 1218–1238.
- [63] J. Beardall i J.A. Raven, *Phycologia* **43** (2004) 26–40.
- [64] R. Geider i J. La Roche, *Eur. J. Phycol.* **37** (2002) 1–17.
- [65] S. Kalenborn, D. Zühlke, G. Reintjes, K. Riedel, R.I. Amann i J. Harder, *Front. Microbiol.* **15** (2024).
- [66] H. Ozanne, H. Toumi, B. Roubinet, L. Landemarre, E. Lespessailles, R. Daniellou i A. Cesaro, *Cosmetics* **7** (2020) 66.
- [67] A. Sichert, C.H. Corzett, M.S. Schechter, F. Unfried, S. Markert, D. Becher, A. Fernandez-Guerra, M. Liebeke, T. Schweder, M.F. Polz i J.-H. Hehemann, *Nat. Microbiol.* **5** (2020) 1026–1039.
- [68] L. Wu, J. Sun, X. Su, Q. Yu, Q. Yu i P. Zhang, *Carbohydr. Polym.* **154** (2016) 96–111.
- [69] B. Kloareg, Y. Badis, J.M. Cock i G. Michel, *Genes (Basel)* **12** (2021) 1059.
- [70] H. Rajpurohit, S. Sharma, P. Sharma i A. Bhandari, *Indian J. Pharm. Sci.* **72** (2010) 689.
- [71] A. Ebringerová i T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.* **21** (2000) 542–556.
- [72] S. Malgas, M.S. Mafa, L. Mkabayi i B.I. Pletschke, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **35** (2019) 187.
- [73] <https://www.megazyme.com/>
- [74] M.G. Villa-Rivera, H. Cano-Camacho, E. López-Romero i M.G. Zavala-Páramo, *Front. Microbiol.* **12** (2021).

- [75] U.M. Kahar, N.A. Latif, S.I. Amran, K.J. Liew i K.M. Goh, *Catalysts* **12** (2022) 143.
- [76] S.K. Bhatia, V. Kumar, V. Kumar, R.K. Bhatia i Y.-H. Yang, *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*, Elsevier, 2023, str. 85–104.
- [77] B.L. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard i B. Henrissat, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) D233–D238.
- [78] P.V. Gavande, A. Goyal i C.M.G.A. Fontes, *Glycoside Hydrolases*, Elsevier, 2023, str. 1–23.
- [79] S. Chen, X. Wang, Y. Guo, X. Song, J. Yin i S. Nie, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **22** (2023) 4831–4870.
- [80] S. Shrivastava, *Industrial Applications of Glycoside Hydrolases*, Springer Singapore, Singapore 2020, str. 3–84.
- [81] P.M. Coutinho, C. Rancurel, M. Stam, T. Bernard, F.M. Couto, E.G.J. Danchin i B. Henrissat, *Bioinformatics for Glycobiology and Glycomics*, Wiley, 2009, str. 89–118.
- [82] S. Chakraborty, A. Rani, A. Dhillon i A. Goyal, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 2017, str. 527–539.
- [83] H. Yucel o K. Ekinici, *Inter. J. of Sec. Metabolite* **9** (2022) 320–334.
- [84] B.L. Cantarel, P.M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard i B. Henrissat, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) D233–D238.
- [85] A. Levasseur, E. Drula, V. Lombard, P.M. Coutinho i B. Henrissat, *Biotechnol. Biofuels* **6** (2013) 41.
- [86] G. Reintjes, C. Arnosti, B.M. Fuchs i R. Amann, *ISME J* **11** (2017) 1640–1650.
- [87] H.-A. Giebel, C. Arnosti, T.H. Badewien, I. Bakenhus, J.P. Balmonte, S. Billerbeck, L. Dlugosch, R. Henkel, B. Kuerzel, J. Meyerjürgens, F. Milke, D. Voss, G. Wienhausen, M. Wietz, H. Winkler, M. Wolterink i M. Simon, *Front. Mar. Sci.* **8** (2021).
- [88] C.C. Lloyd, S. Brown, J.P. Balmonte, A. Hoarfrost, S. Ghobrial i C. Arnosti, *Front. Microbiol.* **13** (2022).
- [89] V. Manna, L. Zoccarato, E. Banchi, C. Arnosti, H. Grossart i M. Celussi, *Environ. Microbiol. Rep.* **14** (2022) 549–558.
- [90] B. Biddanda, M. Ogdahl i J. Cotner, *Limnol. Oceanogr.* **46** (2001) 730–739.
- [91] J.B. Cotner i B.A. Biddanda, *Ecosystems* **5** (2002) 105–121.
- [92] I.C. Torres, B.L. Turner i K.R. Reddy, *Hydrobiologia* **788** (2017) 305–318.
- [93] M.R. Green i J. Sambrook, “*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*”, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2012.

- [94] A.F. Markham, *BMJ* **306** (1993) 441–446.
- [95] J.G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, N. Fierer, A.G. Peña, J.K. Goodrich, J.I. Gordon, G.A. Huttley, S.T. Kelley, D. Knights, J.E. Koenig, R.E. Ley, C.A. Lozupone, D. McDonald, B.D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J.R. Sevinsky, P.J. Turnbaugh, W.A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld i R. Knight, *Nat. Methods*. **7** (2010) 335–336.
- [96] K.E. Ashelford, N.A. Chuzhanova, J.C. Fry, A.J. Jones i A.J. Weightman, *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (2005) 7724–7736.
- [97] E. Bellemain, T. Carlsen, C. Brochmann, E. Coissac, P. Taberlet i H. Kauserud, *BMC Microbiol.* **10** (2010) 189.
- [98] F. Sanger, S. Nicklen i A.R. Coulson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74** (1977) 5463–5467.
- [99] M.L. Metzker, *Nat. Rev. Genet.* **11** (2010) 31–46.
- [100] M.A. Quail, I. Kozarewa, F. Smith, A. Scally, P.J. Stephens, R. Durbin, H. Swerdlow i D.J. Turner, *Nat. Methods* **5** (2008) 1005–1010.
- [101] Y. Lu, Y. Shen, W. Warren i R. Walter, *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*, InTech, 2016.
- [102] T. Ni, D.L. Corcoran, E.A. Rach, S. Song, E.P. Spana, Y. Gao, U. Ohler i J. Zhu, *Nat. Methods* **7** (2010) 521–527.
- [103] K. Chen and L. Pachter, *PLoS Comput. Biol.* (2005) **1** e24.
- [104] A.J. Page, N. De Silva, M. Hunt, M.A. Quail, J. Parkhill, S.R. Harris, T.D. Otto i J.A. Keane, *Microb. Genom.* **2** (2016).
- [105] E.E. Schadt, S. Turner i A. Kasarskis, *Hum. Mol. Genet.* **19** (2010) R227–R240.
- [106] A. Rhoads i K.F. Au, *Genomics Proteomics Bioinformatics* **13** (2015) 278–289.
- [107] J. Alneberg, B.S. Bjarnason, I. de Bruijn, M. Schirmer, J. Quick, U.Z. Ijaz, L. Lahti, N.J. Loman, A.F. Andersson i C. Quince, *Nat. Methods* **11** (2014) 1144–1146.
- [108] J.C. Setubal, *Biophys. Rev.* **13** (2021) 905–909.
- [109] A. Younis, F. Ramzan, Y.-J. Hwang i K.-B. Lim, *Plant Cell Rep.* **34** (2015) 1477–1488.
- [110] L. Hu, K. Ru, L. Zhang, Y. Huang, X. Zhu, H. Liu, A. Zetterberg, T. Cheng i W. Miao, *Biomark. Res.* **2** (2014) 3.
- [111] M.R. Speicher i N.P. Carter, *Nat. Rev. Genet.* **6** (2005) 782–792.

- [112] G. Reintjes, L. Klassen i D.W. Abbott, Visualization of Carbohydrate Uptake Using Fluorescent Polysaccharides, 2023, str. 241–249.
- [113] C. Arnosti, *Org. Geochem.* **25** (1996) 105–115.
- [114] W. Manz, R. Amann, W. Ludwig, M. Vancanneyt i K.-H. Schleifer, *Microbiology (N Y)* **142** (1996) 1097–1106.
- [115] A.E. Parada, D.M. Needham i J.A. Fuhrman, *Environ. Microbiol.* **18** (2016) 1403–1414.
- [116] A. Apprill, S. McNally, R. Parsons i L. Weber, *Aquatic Microbial. Ecology* **75** (2015) 129–137.
- [117] C. Wurzbacher, N. Warthmann, E. Bourne, K. Attermeyer, M. Allgaier, J.R. Powell, H. Detering, S. Mbedi, H.-P. Grossart i M. Monaghan, *MycoKeys* **16** (2016) 17–44.
- [118] P. Pjevac, B. Hausmann, J. Schwarz, G. Kohl, C.W. Herbold, A. Loy i D. Berry, *Front. Microbiol.* **12** (2021).
- [119] B.J. Callahan, P.J. McMurdie, M.J. Rosen, A.W. Han, A.J.A. Johnson i S.P. Holmes, *Nat. Methods* **13** (2016) 581–583.
- [120] R Core Team, A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- [121] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies i F.O. Glöckner, *Nucleic Acids Res.* **41** (2012) D590–D596.
- [122] K. Abarenkov, A. Zirk, T. Piirmann, R. Pöhönen, F. Ivanov, R.H. Nilsson i U. Kõljalg, *UNITE Community* (2020).
- [123] J. Oksanen, G.L. Simpson, F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P.R. Minchin, R.B. O’Hara, P. Solymos, M.H.H. Stevens, E. Szoecs, H. Wagner, M. Barbour, M. Bedward, B. Bolker, D. Borcard, G. Carvalho, M. Chirico, M. De Caceres i S. Durand, *CRAN: Contributed Packages* 2001.
- [124] P.J. McMurdie i S. Holmes, *PLoS One* **8** (2013) e61217.
- [125] Kassambara A, ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.6.0, <https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>. 2023.
- [126] T. Wei i V. Simko, R Package “Corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix. 2021.
- [127] H. Wickham, R. François, L. Henry, K. Müller i D. Vaughan, *CRAN: Contributed Packages*, 2014.
- [128] H. Wickham, *Data Analysis* 2016, str. 189–201.
- [129] A. Chao, *Scandinavian Journal of Statistics* **11** (1984) 265–270.

- [130] E.C. Pielou, *J. Theor. Biol.* **13** (1966) 131–144.
- [131] C.E. Shannon, *Bell System Technical Journal* **27** (1948) 379–423.
- [132] J.N. Paulson, O.C. Stine, H.C. Bravo i M. Pop, *Nat. Methods* **10** (2013) 1200–1202.
- [133] T.L. Morelli, A.B. Smith, A.N. Mancini, E.A. Balko, C. Borgerson, R. Dolch, Z. Farris, S. Federman, C.D. Golden, S.M. Holmes, M. Irwin, R.L. Jacobs, S. Johnson, T. King, S.M. Lehman, E.E. Louis, A. Murphy, H.N.T. Randriahaingo, H.L.L. Randrianarimanana, J.Ratsimbazafy, O.H. Razafindratsima i A.L. Baden, *Nat. Clim. Chang.* **10** (2020) 89–96.
- [134] R.J. Hijmans, *CRAN: Contributed Packages*, 2010.
- [135] C.-H. Gao, G. Yu i P. Cai, *Front. Genet.* **12** (2021).
- [136] J.C. Stegen, X. Lin, J.K. Fredrickson i A.E. Konopka, *Front. Microbiol.* **6** (2015).
- [137] M. Radišić, J. Rubinić, I. Ružić i A. Brozinčević, *Hydrology* **8** (2021) 174.
- [138] K. Kajan, H. Osterholz, J. Stegen, M. Gligora Udovič i S. Orlić, *Water Res.* **245** (2023) 120653.
- [139] R.I. Amann, *Molecular Microbial Ecology Manual*, Springer Netherlands, Dordrecht 1995, str. 331–345.
- [140] H. Daims, A. Brühl, R. Amann, K.-H. Schleifer i M. Wagner, *Syst. Appl. Microbiol.* **22** (1999) 434–444.
- [141] J.C. Ibal, H.Q. Pham, C.E. Park i J.-H. Shin, *PLoS One* **14** (2019) e0212090.
- [142] D. Li, C.-M. Liu, R. Luo, K. Sadakane i T.-W. Lam, *Bioinformatics* **31** (2015) 1674–1676.
- [143] B. Langmead i S.L. Salzberg, *Nat. Methods* **9** (2012) 357–359.
- [144] Y.-W. Wu, B.A. Simmons i S.W. Singer, *Bioinformatics* **32** (2016) 605–607.
- [145] B. Buchfink, C. Xie i D.H. Huson, *Nat. Methods* **12** (2015) 59–60.
- [146] M.R. Olm, C.T. Brown, B. Brooks i J.F. Banfield, *ISME J* **11** (2017) 2864–2868.
- [147] A. Chklovski, D.H. Parks, B.J. Woodcroft i G.W. Tyson, *Nat. Methods* **20** (2023) 1203–1212.
- [148] P.-A. Chaumeil, A.J. Mussig, P. Hugenholtz i D.H. Parks, *Bioinformatics* (2020) **36**, 1925–1927.
- [149] T. Seemann, *Bioinformatics*, **30** (2014) 2068–2069.
- [150] Y. Yin, X. Mao, J. Yang, X. Chen, F. Mao i Y. Xu, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) W445–W451.
- [151] J. Mattock and M. Watson, *Nat. Methods* **20** (2023) 1170–1173.
- [152] M. Campbell, *Learn RStudio IDE*, Apress, Berkeley, CA 2019, str. 63–72.
- [153] G. Yu, *Curr. Protoc. Bioinformatics* **69** (2020).

- [154] J. Podani i B. Csányi, *Ecol. Indic.* **10** (2010) 1119–1124.
- [155] M. Almazroui i Z. Şen, *Earth Systems and Environment* **4** (2020) 713–738.
- [156] J.P. Niño-García, C. Ruiz-González i P.A. del Giorgio, *ISME J* **10** (2016) 1755–1766.
- [157] X. Tang, G. Xie, K. Shao, Y. Hu, J. Cai, C. Bai, Y. Gong i G. Gao, *Environ. Microbiome* **15** (2020) 10.
- [158] J. Chen, P. Wang, C. Wang, X. Wang, L. Miao, S. Liu, Q. Yuan i S. Sun, *Environ. Microbiol.* **22** (2020) 832–849.
- [159] S. Matsuoka, Y. Sugiyama, H. Sato, I. Katano, K. Harada i H. Doi, *Metabarcoding Metagenom.* **3** (2019).
- [160] E.S. LeBrun, D.L. Taylor, R.S. King, J.A. Back i S. Kang, *Fungal Ecol.* **32** (2018) 72–79.
- [161] K. Deiner, E.A. Fronhofer, E. Mächler, J.-C. Walser i F. Altermatt, *Nat. Commun.* **7** (2016) 12544.
- [162] H. Zhang, Y. Yan, T. Lin, W. Xie, J. Hu, F. Hou, Q. Han, X. Zhu i D. Zhang, *Microbiol. Spectr.* **10** (2022).
- [163] C. Ruiz-González, J.P. Niño-García, S.W. Kembel i P.A. del Giorgio, *ISME J* **11** (2017) 2012–2021.
- [164] F.-J. Yue, S. Waldron, S.-L. Li, Z.-J. Wang, J. Zeng, S. Xu, Z.-C. Zhang i D.M. Oliver, *Science of The Total Environment* **696** (2019) 134062.
- [165] Y. Liu, X. Qu, J.J. Elser, W. Peng, M. Zhang, Z. Ren, H. Zhang, Y. Zhang i H. Yang, *Water (Basel)* **11** (2019) 1711.
- [166] R. Kostanjšek, L. Pašić, H. Daims i B. Sket, *Microb. Ecol.* **66** (2013) 5–18.
- [167] M.T. Madigan, D.O. Jung, C.R. Woese i L.A. Achenbach, *Arch. Microbiol.* **173** (2000) 269–277.
- [168] A.S. Bandh, S. Shafi i N. Shameem, “*Freshwater Microbiology*”, Elsevier, (2019).
- [169] Y. Espín, A. Menchén, J.L. Moreno, D. Sanz, M. Álvarez-Ortí, J.A. Fernández i J.J. Gómez-Alday, *Applied Sciences* **11** (2021) 6309.
- [170] T. Brad, M. Bizic, D. Ionescu, C.M. Chiriac, M. Kenesz, C. Roba, A. Ionescu, A. Fekete, I.C. Mirea i O.T. Moldovan, *Water (Basel)* **14** (2022) 1597.
- [171] D. Xiao, X. He, W. Zhang, P. Hu, M. Sun i K. Wang, *Science of The Total Environment* **822** (2022) 153179.
- [172] Q. Chen, Y. Chen, J. Yang, S.C. Maberly, J. Zhang, J. Ni, G. Wang, D. Tonina, L. Xiao i H. Ma, *Limnol. Oceanogr.* **66** (2021) 4363–4374.

- [173] Q. He, Q. Xiao, J. Fan, H. Zhao, M. Cao, C. Zhang i Y. Jiang, *Science of The Total Environment* **815** (2022) 152576.
- [174] B. Luef, K.R. Frischkorn, K.C. Wrighton, H.-Y.N. Holman, G. Birarda, B.C. Thomas, A. Singh, K.H. Williams, C.E. Siegerist, S.G. Tringe, K.H. Downing, L.R. Comolli i J.F. Banfield, *Nat. Commun.* **6** (2015) 6372.
- [175] R.S. Kantor, K.C. Wrighton, K.M. Handley, I. Sharon, L.A. Hug, C.J. Castelle, B.C. Thomas i J.F. Banfield, *MBio* **4** (2013).
- [176] M. Opalički Slabe, T. Danevčič, K. Hug, L. Fillinger, I. Mandić-Mulec, C. Griebler i A. Brancelj, *Aquatic Microbial Ecology* **86** (2021) 99–114.
- [177] G.M. David, P. López-García, D. Moreira, B. Alric, P. Deschamps, P. Bertolino, G. Restoux, E. Rochelle-Newall, E. Thébault, M. Simon i L. Jardillier, *Mol. Ecol.* **30** (2021) 2162–2177.
- [178] F.H. Gleason, A. V. Marano, A.L. Digby, N. Al-Shugairan, O. Lilje, M.M. Steciow, M.D. Barrera, S. Inaba i A. Nakagiri, *Hydrobiologia* **659** (2011) 55–64.
- [179] S. Seena, F. Bärlocher, O. Sobral, M.O. Gessner, D. Dudgeon, B.G. McKie, E. Chauvet, L. Boyero, V. Ferreira, A. Frainer, A. Bruder, C.D. Matthaei, S. Fenoglio, K.R. Sridhar, R.J. Albariño, M.M. Douglas, A.C. Encalada, E. Garcia, S.D. Ghate, D.P. Giling, V. Gonçalves, T. Iwata, A. Landeira-Dabarca, D. McMaster, A.O. Medeiros, J. Naggea, J. Pozo, P.M. Raposeiro, C. M. Swan, N. S.D. Tenkiano, C.M. Yule i M.A.S. Graça, *Science of The Total Environment* **661** (2019) 306–315.
- [180] Y. Senga, S. Yabe, T. Nakamura i M. Kagami, *Water Res.* **145** (2018) 346–353.
- [181] L. Muggia i M. Grube, *Life* **8** (2018) 15.
- [182] N. Zhang, Y. Li, T. Wubet, H. Bruelheide, Y. Liang, W. Purahong, F. Buscot i K. Ma, *Soil Biol. Biochem.* **127** (2018) 120–126.
- [183] M. Madhaiyan, S. Poonguzhali, M. Senthilkumar, D. Pragatheswari, J.-S. Lee i K.-C. Lee, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65** (2015) 578–586.
- [184] Y. Li, C.B. Naman, K.L. Alexander, H. Guan i W.H. Gerwick, *Mar. Drugs* **18** (2020) 508.
- [185] K. Kuroda, T. Narihiro, F. Shinshima, M. Yoshida, H. Yamaguchi, H. Kurashita, N. Nakahara, M.K. Nobu, T.Q.P. Noguchi, M. Yamauchi i M. Yamada, *Water Res.* **219** (2022) 118581.
- [186] R. Mehrotra i K. Aneja, “*An Introduction to Mycology*”, Wiley Eastern Ltd., New Delhi 1990.
- [187] C. Arnosti, M. Wietz, T. Brinkhoff, J.-H. Hehemann, D. Probandt, L. Zeugner i R. Amann, *Ann. Rev. Mar. Sci.* **13** (2021) 81–108.

- [188] W. Siuda i R. Chrost, *Pol. J. Environ. Stud.* **11** (2002) 53–66.
- [189] N. Hanžek, M. Gligora Udovič, K. Kajan, G. Borics, G. Várbíró, T. Stoeck, S. Orlić i I. Stanković, *Hydrobiologia* **851** (2024) 1015–1034.
- [190] M.C. Hennemann and M.M. Petrucio, *Acta Limnologica Brasiliensia* **22** (2010) 295–305.
- [191] L. Thieme, D. Graeber, D. Hofmann, S. Bischoff, M.T. Schwarz, B. Steffen, U.-N. Meyer, M. Kaupenjohann, W. Wilcke, B. Michalzik i J. Siemens, *Biogeosciences* **16** (2019) 1411–1432.
- [192] S. Brown, C.C. Lloyd, G. Giljan, S. Ghobrial, R. Amann i C. Arnosti, *Environ. Microbiol.* **26** (2024).
- [193] Q.K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan i G.S. Hoondal, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** (2001) 326–338.
- [194] X. Li, B. Peng, P. Chi-Keung Cheung, J. Wang, X. Zheng i L. You, *Food Hydrocoll.* **130** (2022) 107687.
- [195] R.S. Singh, G.K. Saini i J.F. Kennedy, *Carbohydr. Polym.* **73** (2008) 515–531.
- [196] F. Liu, J. Zhang, L. Zhang, M. Diao, P. Ling i F. Wang, *Int. J. Biol. Macromol.* **177** (2021) 252–260.
- [197] A. Amend, G. Burgaud, M. Cunliffe, V.P. Edgcomb, C.L. Ettinger, M.H. Gutiérrez, J. Heitman, E.F.Y. Hom, G. Ianiri, A.C. Jones, M. Kagami, K.T. Picard, C.A. Quandt, S. Raghukumar, M. Riquelme, J. Stajich, J. Vargas-Muñiz, A.K. Walker, O. Yarden i A.S. Gladfelter, *MBio* **10** (2019).
- [198] R. Sekar, A. Pernthaler, J. Pernthaler, F. Warnecke, T. Posch i R. Amann, *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (2003) 2928–2935.
- [199] T.L. Dickerson i H.N. Williams, *Microb. Ecol.* **67** (2014) 34–44.
- [200] J.B. Logue, S. Langenheder, A.F. Andersson, S. Bertilsson, S. Drakare, A. Lanzén i E.S. Lindström, *ISME J* **6** (2012) 1127–1136.
- [201] A. Eiler and S. Bertilsson, *Environ. Microbiol.* **6** (2004) 1228–1243.
- [202] G.S. Bullerjahn, R.M.L. McKay, G. Bernát, O. Prášil, L. Vörös, K. Pálffy, N. Tugyi i B. Somogyi, *J. Great Lakes Res.* **46** (2020) 732–740.
- [203] Q. Liu, F. Chang, P. Xie, Y. Zhang, L. Duan, H. Li, X. Zhang, Y. Zhang, D. Li i H. Zhang, *Chemosphere*, **314** (2023) 137700.
- [204] M. Farkas, E. Kaszab, J. Radó, J. Háhn, G. Tóth, P. Harkai, Á. Ferincz, Z. Lovász, A. Tánácsics, L. Vörös, B. Kriszt i S. Szoboszlai, *Curr. Microbiol.* **77** (2020) 4016–4028.

- [205] P. Zhang, P. Huang, X. Xu, H. Sun, B. Jiang i Y. Liao, *Science of The Total Environment* **708** (2020) 134619.
- [206] M.R. Pino-Otín, G. Lorca, E. Langa, F. Roig, E.M. Terrado i D. Ballesterro, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 16960.
- [207] S. Wu, L. Zhong, S. Liao, T. Li, Z. Zhou i G. Wang, *Arch. Microbiol.* **203** (2021) 967–973.
- [208] M.S. Deshpande, V.B. Rale i J.M. Lynch, *Enzyme Microb. Technol.* **14** (1992) 514–527.
- [209] O.D. Kaboré, S. Godreuil i M. Drancourt, *Front. Cell Infect. Microbiol.* **10** (2020).
- [210] S. Wiegand, M. Jogler, C. Boedeker, D. Pinto, J. Vollmers, E. Rivas-Marín, T. Kohn, S.H. Peeters, A. Heuer, P. Rast, S. Oberbeckmann, B. Bunk, O. Jeske, A. Meyerdierks, J.E. Storesund, N. Kallscheuer, S. Lücker, O.M. Lage, T. Pohl, B.J. Merkel, P. Hornburger, R.-W. Müller, F. Brümmer, M. Labrenz, A.M. Spormann, H.J.M. Op den Camp, J. Overmann, R. Amann, M.S.M. Jetten, T. Mascher, M.Y. Galperin i C. Jogler, *Nat. Microbiol.* **5** (2019) 126–140.
- [211] H. Schlesner i E. Stackebrandt, *Syst. Appl. Microbiol.* **8** (1986) 174–176.
- [212] C.-C. Sun, W.-J. Zhao, W.-Z. Yue, H. Cheng, F.-L. Sun, Y.-T. Wang, M.-L. Wu, A. Engel i Y.-S. Wang, *Fron Microbiol.* **14** (2023).
- [213] E. Chiang, M.L. Schmidt, M.A. Berry, B.A. Biddanda, A. Burtner, T.H. Johengen, D. Palladino i V.J. Denef, *PLoS One* **13** (2018) e0206396.
- [214] U. Nunes da Rocha, J.D. van Elsas i L.S. van Overbeek, *FEMS Microbiol. Ecol.* **78** (2011) 297–305.
- [215] T. Felföldi, S. Ramganes, B. Somogyi, G. Krett, L. Jurecska, A. Szabó, L. Vörös, K. Márialigeti i I. Máthé, *Geomicrobiol. J.* **33** (2016) 494–504.
- [216] R. Kant, M.W.J. van Passel, A. Palva, S. Lucas, A. Lapidus, T. Glavina del Rio, E. Dalin, H. Tice, D. Bruce, L. Goodwin, S. Pitluck, F.W. Larimer, M.L. Land, L. Hauser, P. Sangwan, W.M. de Vos, P.H. Janssen i H. Smidt, *J. Bacteriol.* **193** (2011) 2902–2903.
- [217] X. Liu i H. Li, *Desalination Water Treat.* **158** (2019) 105–113.
- [218] Z. Cardman, C. Arnosti, A. Durbin, K. Ziervogel, C. Cox, A.D. Steen i A. Teske, *Appl. Environ. Microbiol.* **80** (2014) 3749–3756.
- [219] K. Song, Y. Xue, L. Li, M. Deng i X. Zhao, *Water Res.* **223** (2022) 119017.
- [220] D.P.R. Herlemann, D. Lundin, M. Labrenz, K. Jürgens, Z. Zheng, H. Aspeborg i A.F. Andersson, *MBio* **4** (2013).
- [221] Y. Chen, T. Lin i W. Chen, *Journal of Environmental Sciences* **78** (2019) 315–327.

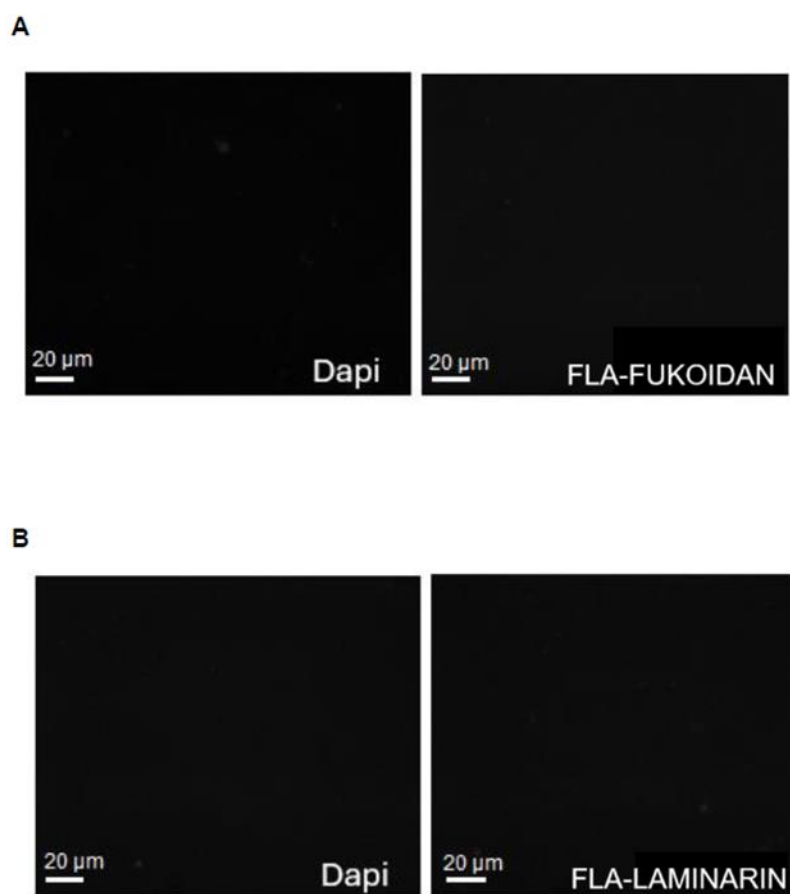
- [222] A. Bukowska, T. Kaliński i R. Chróst, *Aquatic Microbial Ecology* **82** (2018) 129–144.
- [223] X. Wang, J. Li, J. Zheng, L. Zhao, C. Ruan, D. Zhang i X. Pan, *Science of The Total Environment* **914** (2024) 169976.
- [224] I. Bakenhus, B. Wemheuer, P. Akyol, H.-A. Giebel, L. Dlugosch, R. Daniel i M. Simon, *Syst. Appl. Microbiol.* **42** (2019) 126000.
- [225] J.P. Brooks, D.J. Edwards, M.D. Harwich, M.C. Rivera, J.M. Fettweis, M.G. Serrano, R.A. Reris, N.U. Sheth, B. Huang, P. Girerd, J.F. Strauss, K.K. Jefferson i G.A. Buck, *BMC Microbiol.* **15** (2015) 66.
- [226] M. Bashenkhayeva, Y. Yeletskaya, I. Tomberg, A. Marchenkov, L. Titova i Y. Galachyants, *Diversity (Basel)* **15** (2023) 572.
- [227] R.H. Dahal, D.K. Chaudhary, D.-U. Kim i J. Kim, *Arch. Microbiol.* **203** (2021) 377–382.
- [228] J. Pascual, M. García-López, I. González i O. Genilloud, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67** (2017) 3951–3959.
- [229] S.-Y. Sheu, L.-C. Chen, C.-C. Yang, A. Carlier i W.-M. Chen, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **70** (2020) 6381–6389.
- [230] Rubiyatno, K. Mori, D. Inoue, S. Kim, J. Yu, T. Lee, M. Ike i T. Toyama, *Microorganisms* **9** (2021) 1496.
- [231] P. Kämpfer, A. Lipski, K.S. Lawrence, W.R. Olive, M.M. Newman, J.A. McInroy i T. Viver, *Syst. Appl. Microbiol.* **48** (2025) 126588.
- [232] K. Watanabe, N. Komatsu, Y. Ishii i M. Negishi, *FEMS Microbiol. Ecol.* **67** (2009) 57–68.
- [233] D. Tsementzi, L.M. Rodriguez-R, C.A. Ruiz-Perez, A. Meziti, J.K. Hatt i K.T. Konstantinidis, *Syst. Appl. Microbiol.* **42** (2019) 495–505.
- [234] A. Vinasyiam, M.C.J. Verdegem, J. Ekasari, J.W. Schrama i F. Kokou, *Aquaculture* **594** (2025) 741396.
- [235] M. Farmer, R. Rajasabhai, W. Tarpeh, K. Tyo i G. Wells, *Front. Microbiol.* **14** (2023).
- [236] C. Sjöqvist, L.F. Delgado, J. Alneberg i A.F. Andersson, *ISME J* **15** (2021) 3034–3049.
- [237] F.J. Afolabi, B.R. Babaniyi i M.P. Obagunwa, *Occurrence and Distribution of Microbial Enzymes in Freshwater* 2022, str. 61–82.
- [238] R.J. Chróst, *Environmental Control of the Synthesis and Activity of Aquatic Microbial Ectoenzymes* 1991, str. 29–59.
- [239] A.C. Andrade, A. Fróes, F.Á.C. Lopes, F.L. Thompson, R.H. Krüger, E. Dinsdale i T. Bruce, *Microb. Ecol.* **74** (2017) 89–105.

- [240] L.L. Lairson, B. Henrissat, G.J. Davies i S.G. Withers, *Annu. Rev. Biochem.* **77** (2008) 521–555.
- [241] K.M. Ruane, G.J. Davies i C. Martinez-Fleites, *Proteins: Structure, Function i Bioinformatics* **73** (2008) 784–787.
- [242] O.Yu. Troshina, D.G. Naumoff, V.I. Rechkina i V.A. Shcherbakova, *Microbiology (N Y)* **93** (2024) 551–562.
- [243] T.R. Tuveng, U. Rothweiler, G. Udatha, G. Vaaje-Kolstad, A. Smalås i V.G.H. Eijsink, *PLoS One* **12** (2017) e0187544.
- [244] A.O. dos S. Melo-Nascimento, C. Treumann, C. Neves, E. Andrade, A.C. Andrade, R. Edwards, E. Dinsdale i T. Bruce, *Arch. Microbiol.* **200** (2018) 1267–1278.
- [245] S.J. Traving, U.H. Thygesen, L. Riemann i C.A. Stedmon, *Appl. Environ. Microbiol.* **81** (2015) 7385–7393.
- [246] K.M. Ruane, G.J. Davies i C. Martinez-Fleites, *Proteins: Structure, Function i Bioinformatics* **73** (2008) 784–787.
- [247] A.H. Viborg, N. Terrapon, V. Lombard, G. Michel, M. Czjzek, B. Henrissat i H. Brumer, *Journal of Biological Chemistry* **294** (2019) 15973–15986.
- [248] A. Suga, M. Nagae, Y. Yamaguchi, *Glycobiology* **28** (2018) 774–785.
- [249] M. Strohmeier, M. Hrmova, M. Fischer, A.J. Harvey, G.B. Fincher i J. Pleiss, *Protein Science* **13** (2004) 3200–3213.
- [250] H. Huang, Z. Zheng, X. Zou, Z. Wang, R. Gao, J. Zhu, Y. Hu i S. Bao, *Mar. Drugs* **20** (2022) 388.
- [251] C. Kmezik, D. Krska, S. Mazurkewich i J. Larsbrink, *Sci. Rep.* **11** (2021) 17662.
- [252] J.C.K. Quirke and D. Crich, *ACS Catal.* **11** (2021) 10308–10315.
- [253] Q. Lyu, K. Zhang, Q. Zhu, Z. Li, Y. Liu, E. Fitzek, T. Yohe, L. Zhao, W. Li, T. Liu, Y. Yin i W. Liu, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1862** (2018) 1862–1869.
- [254] M. Schultz-Johansen, P.K. Bech, R.C. Hennessy, M.A. Glaring, T. Barbeyron, M. Czjzek i P. Stougaard, *Front. Microbiol.* **9** (2018).
- [255] C.E. Nelson, M.A. Attia, A. Rogowski, C. Morland, H. Brumer i J.G. Gardner, *Environ. Microbiol.* **19** (2017) 5025–5039.

§ 8. DODATAK

Dodatna tablica 1. Detaljan popis lokacija uzorkovanja, skraćenice podijeljene u 3 tipa vodotoka unutar slatkovodnog povezanog ekosustava Plitvičkih jezera.

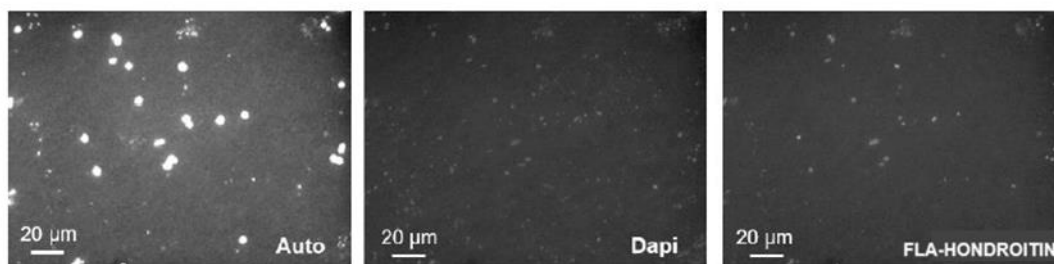
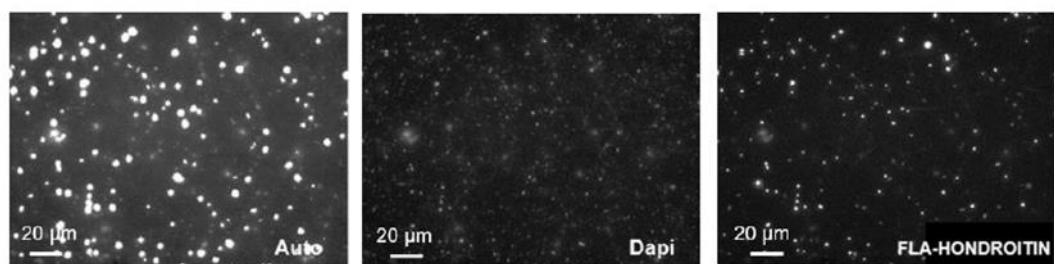
Uzorak	Kratika	Lokacija	Tip vodotoka
P1	IBR	Bijela rijeka	pritoci
P2	BR		
P3	VUK		
P4	LJES		
P5	ICR	Crna rijeka	
P6	CR		
P7	MAT	rijeka Matica	
P8	IS	Sušanj	
P9	SUŠ		
P10	RJEČ1	Rječica	
P11	RJEČ2		
P12	SAR	Sartuk	
P13	SAR1		
P14	IPP	Plitvica	
P15	PP		
P16	PP1		
P17	DR	Korenička	
P18	RK		
MT19	LAB1	Labudovačke barijere	međujezerski tokovi
MT20	LAB2		
MT21	GRAD1	Gradinsko jezero	
MT22	GRAD2		
MT23	KM	Kozjački mostovi	
MT24	NB	jezero Novakovića Brod	
K25	KOR	rijeka Korana	rijeka Korana



Dodatna slika 1. Mikroskopske slike negativnih kontrola autoklavirane uzorkovane vode obojane DAPI-jem i FLA-fucoidan u Crniševu proljeće 0.dan (A) i DAPI i FLA-laminarin u Crniševu na zimu 12.dan (B) snimljene na DAPI i FLAP signalu.

Dodatna tablica 2. Detaljan opis korištenih probi za fluorescentnu *in situ* hibridizaciju preuzet iz probeBase, baze rRNA ciljanih oligonukleotidnih probi i početnica iz SILVA baze podataka.

Proba	Ime probe	Taksonomija	Specifičnost	Pozicija	Sekvenca	G+C	Duljina [nt]
						[%]	
EUB338 I	S-D-Bact-0338-a-A-18	Bacteria	većina Bacteria	338-355	5'- GCT GCC TCC CGT AGG AGT -3'	67	18
EUB338 II	S-*BactP-0338-a-A-18	Planctomycetales; Planctomycetia; Planctomycetes; Bacteria	Planctomycetales	338-355	5'- GCA GCC ACC CGT AGG TGT -3'	67	18
EUB338 III	S-*BactV-0338-a-A-18	Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobia; Chlamydiae/Verrucomicrobia; Bacteria	Verrucomicrobiales	338-355	5'- GCT GCC ACC CGT AGG TGT -3'	67	18
CF319a		Flavobacteriia; Bacteroidetes; Bacteroidetes/Chlorobi; Bacteria	Većina Flavobacteria,	319-336	5'- TGG TCC GTG TCT CAG TAC -3'	56	18
			neke Bacteroidetes,				
			neke Sphingobacteria				

A**B**

Dodatna slika 2. Automatizirane mikroskopske slike stanica obojenih DAPI i FLA-hondroitin sulfatom u ljetu Kozjak (A) i DAPI i FLA-hondroitin sulfatom u ljetu Crniševo (B) snimljene na auto, DAPI i FLAP signal.

Dodatna tablica 3. Okolišni parametri izmjereni na 25 lokacija unutar slatkovodnog povezanog ekosustava Plitvičkih jezera.

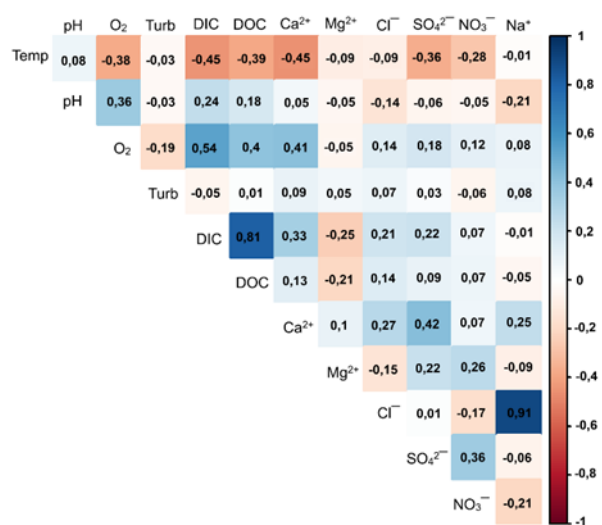
Uzorak	Sezona uzorkovanja	pH	DIC (mg/L)	Mag ²⁺ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	Na ⁺ (mg/L)	Longituda	Latituda	Količina padalina (mm)
P1	proljeće 2019	7,70	12,46	27,71	2,88	1,38	44.83324	15.55742	421,22
P2	proljeće 2019	8,45	10,93	20,42	0,96	0,46	44.84151	15.59712	421,22
P3	proljeće 2019	8,46	14,24	28,93	3,84	0,69	44.83874	15.56471	421,22
P4	proljeće 2019	8,37	11,26	26,25	0,96	0,92	44.84276	15.59948	421,22
P5	proljeće 2019	8,37	11,26	26,25	0,96	0,92	44.828861	15.613972	421,22
P6	proljeće 2019	7,94	10,75	17,50	2,88	0,69	44.8398	15.6	421,22
P7	proljeće 2019	8,15	11,77	21,64	2,88	0,92	44.84855	15.60314	421,22
P8	proljeće 2019	8,03	13,76	25,28	2,88	0,46	44.859792	15.578872	421,22
P9	proljeće 2019	7,88	14,66	26,25	4,80	0,46	44.853382	15.589129	421,22
P10	proljeće 2019	8,12	15,15	30,14	2,88	0,46	44.84929	15.62626	421,22
P11	proljeće 2019	8,08	13,25	30,63	2,88	0,46	44.87457	15.61264	421,22
P12	proljeće 2019	8,40	12,93	29,42	2,88	0,46	44.91136	15.57643	421,22
P13	proljeće 2019	8,52	12,90	26,01	2,88	0,46	44.90627	15.57911	421,22
P14	proljeće 2019	7,67	12,78	22,61	2,88	0,46	44.90148	15.57403	421,22
P15	proljeće 2019	8,35	10,53	22,85	2,88	0,46	44.903833	15.593583	421,22
P16	proljeće 2019	8,39	9,60	22,12	1,92	0,69	44.90234	15.60834	421,22
P17	proljeće 2019	8,25	11,95	13,61	1,92	1,15	44.78385	15.65708	421,22
P18	proljeće 2019	8,37	11,64	23,09	1,92	2,07	44.76938	15.69103	421,22
MT19	proljeće 2019	8,14	11,63	19,20	1,92	0,92	44.871571	15.596254	421,22
MT20	proljeće 2019	8,15	10,87	19,45	2,88	0,92	44.872169	15.599203	421,22
MT21	proljeće 2019	8,17	9,50	17,26	1,92	0,92	44.87945	15.61344	421,22
MT22	proljeće 2019	7,98	10,14	19,20	1,92	0,92	44.876972	15.613583	421,22
MT23	proljeće 2019	8,17	8,43	18,72	2,88	0,92	44.89443	15.60914	421,22
MT24	proljeće 2019	8,24	7,89	19,93	0,96	0,69	44.90189	15.6101	421,22
K25	proljeće 2019	8,43	7,83	19,93	1,92	0,69	44.924056	15.61475	421,22
P1	ljetno 2019	7,44	7,60	24,80	2,88	1,38	44.83324	15.55742	52,30
P2	ljetno 2019	8,14	6,31	20,42	1,92	0,46	44.84151	15.59712	52,30

P3	ljeto 2019	8,24	7,41	29,90	3,84	0,46	44.83874	15.56471	52,30
P4	ljeto 2019	8,10	6,42	20,42	2,88	0,92	44.84276	15.59948	52,30
P5	ljeto 2019	7,41	3,72	18,23	3,84	0,92	44.828861	15.613972	52,30
P6	ljeto 2019	8,04	1,22	20,18	4,80	0,69	44.8398	15.6	52,30
P7	ljeto 2019	8,03	0,81	22,85	2,88	0,69	44.84855	15.60314	52,30
P8	ljeto 2019	7,95	4,02	23,82	4,80	0,46	44.859792	15.578872	52,30
P9	ljeto 2019	7,48	0,97	28,69	4,80	0,46	44.853382	15.589129	52,30
P10	ljeto 2019	8,04	4,66	31,12	3,84	0,46	44.84929	15.62626	52,30
P11	ljeto 2019	8,01	9,32	30,87	3,84	0,46	44.87457	15.61264	52,30
P12	ljeto 2019	8,32	6,18	24,31	1,92	0,46	44.91136	15.57643	52,30
P13	ljeto 2019	8,38	6,74	22,61	2,88	0,46	44.90627	15.57911	52,30
P14	ljeto 2019	7,41	3,56	15,07	3,84	0,23	44.90148	15.57403	52,30
P15	ljeto 2019	8,12	6,75	20,42	3,84	0,46	44.903833	15.593583	52,30
P16	ljeto 2019	8,19	3,61	20,66	3,84	0,46	44.90234	15.60834	52,30
P17	ljeto 2019	8,11	5,61	27,47	2,88	0,69	44.78385	15.65708	52,30
P18	ljeto 2019	8,08	8,28	25,04	3,84	2,30	44.76938	15.69103	52,30
MT19	ljeto 2019	8,07	7,55	22,12	2,88	0,92	44.871571	15.596254	52,30
MT20	ljeto 2019	8,16	7,50	21,39	2,88	0,69	44.872169	15.599203	52,30
MT21	ljeto 2019	8,16	7,50	21,39	2,88	0,69	44.87945	15.61344	52,30
MT22	ljeto 2019	8,00	6,75	19,69	2,88	0,92	44.876972	15.613583	52,30
MT23	ljeto 2019	8,17	7,12	20,18	2,88	0,69	44.89443	15.60914	52,30
MT24	ljeto 2019	8,23	5,07	19,93	2,88	0,92	44.90189	15.6101	52,30
K25	ljeto 2019	8,17	0,74	19,20	1,92	0,69	44.924056	15.61475	52,30
P1	zima 2020	7,80	15,32	30,48	3,84	1,61	44.83324	15.55742	44,80
P2	zima 2020	8,31	14,84	22,12	2,88	0,69	44.84151	15.59712	44,80
P3	zima 2020	8,30	16,57	34,96	4,80	0,69	44.83874	15.56471	44,80
P4	zima 2020	8,31	14,84	22,12	2,88	0,69	44.84276	15.59948	44,80
P5	zima 2020	7,52	14,44	16,82	3,84	1,15	44.828861	15.613972	44,80
P6	zima 2020	8,16	14,28	18,48	3,84	1,15	44.8398	15.6	44,80
P7	zima 2020	8,21	14,62	22,37	3,84	1,15	44.84855	15.60314	44,80
P8	zima 2020	8,12	14,88	25,67	4,80	0,69	44.859792	15.578872	44,80
P9	zima 2020	7,66	15,74	32,33	4,80	0,69	44.853382	15.589129	44,80
P10	zima 2020	8,29	17,87	39,72	4,80	0,69	44.84929	15.62626	44,80
P11	zima 2020	8,06	13,44	34,47	3,74	0,62	44.87457	15.61264	44,80
P12	zima 2020	8,51	15,45	32,28	3,84	0,46	44.91136	15.57643	44,80
P13	zima 2020	8,51	15,45	32,28	3,84	0,46	44.90627	15.57911	44,80
P14	zima 2020	7,64	15,84	26,30	4,80	0,69	44.90148	15.57403	44,80
P15	zima 2020	8,38	15,43	25,91	4,80	0,23	44.903833	15.593583	44,80
P16	zima 2020	8,45	14,76	26,35	4,80	0,46	44.90234	15.60834	44,80
P17	zima 2020	7,52	15,75	20,18	2,88	20,23	44.78385	15.65708	44,80
P18	zima 2020	8,29	15,58	24,80	2,88	2,53	44.76938	15.69103	44,80
MT19	zima 2020	8,12	12,48	20,18	3,55	1,01	44.871571	15.596254	44,80
MT20	zima 2020	8,19	15,24	19,74	3,55	0,99	44.872169	15.599203	44,80

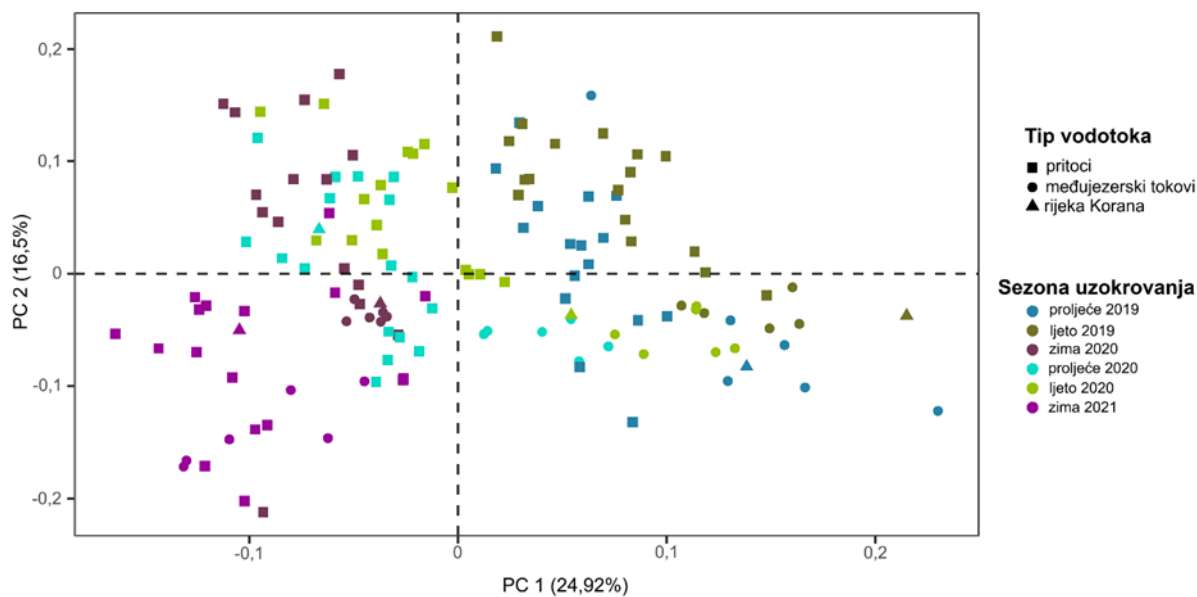
MT21	zima 2020	8,17	12,52	19,74	3,44	1,01	44.87945	15.61344	44,80
MT22	zima 2020	8,17	11,90	19,16	3,50	1,14	44.876972	15.613583	44,80
MT23	zima 2020	8,22	12,61	21,44	3,47	0,93	44.89443	15.60914	44,80
MT24	zima 2020	8,28	13,71	21,68	3,45	0,97	44.90189	15.6101	44,80
MT25	zima 2020	8,40	13,94	22,27	3,84	0,92	44.924056	15.61475	44,80
P1	proljeće 2020	8,35	25,58	31,60	3,84	1,38	44.83324	15.55742	161,50
P2	proljeće 2020	8,59	21,47	15,80	2,88	0,69	44.84151	15.59712	161,50
P3	proljeće 2020	8,60	26,26	34,76	4,80	0,69	44.83874	15.56471	161,50
P4	proljeće 2020	8,51	22,10	26,01	3,84	0,92	44.84276	15.59948	161,50
P5	proljeće 2020	8,33	24,20	14,10	3,84	1,15	44.828861	15.613972	161,50
P6	proljeće 2020	8,49	24,42	15,56	3,84	1,38	44.8398	15.6	161,50
P7	proljeće 2020	8,53	24,75	19,20	3,84	0,92	44.84855	15.60314	161,50
P8	proljeće 2020	8,40	25,63	27,71	4,80	0,69	44.859792	15.578872	161,50
P9	proljeće 2020	8,37	25,89	29,42	4,80	0,69	44.853382	15.589129	161,50
P10	proljeće 2020	8,45	22,90	33,55	3,84	0,46	44.84929	15.62626	161,50
P11	proljeće 2020	8,23	25,85	34,76	3,84	0,69	44.87457	15.61264	161,50
P12	proljeće 2020	8,60	21,94	30,87	2,88	0,69	44.91136	15.57643	161,50
P13	proljeće 2020	8,72	22,17	29,90	2,88	0,69	44.90627	15.57911	161,50
P14	proljeće 2020	8,37	24,55	19,69	3,84	0,69	44.90148	15.57403	161,50
P15	proljeće 2020	8,47	24,61	20,18	3,84	0,69	44.903833	15.593583	161,50
P16	proljeće 2020	8,51	24,31	20,66	4,80	0,69	44.90234	15.60834	161,50
P17	proljeće 2020	8,36	21,69	13,86	2,88	0,69	44.78385	15.65708	161,50
P18	proljeće 2020	8,48	22,48	23,34	2,88	2,30	44.76938	15.69103	161,50
MT19	proljeće 2020	8,35	23,98	19,93	3,84	0,92	44.871571	15.596254	161,50
MT20	proljeće 2020	8,36	24,36	19,93	3,84	0,92	44.872169	15.599203	161,50
MT21	proljeće 2020	8,41	23,77	19,20	3,84	0,92	44.87945	15.61344	161,50
MT22	proljeće 2020	8,43	23,76	19,45	2,88	0,92	44.876972	15.613583	161,50
MT23	proljeće 2020	8,41	23,60	21,15	2,88	0,92	44.89443	15.60914	161,50
MT24	proljeće 2020	8,49	23,75	21,64	3,84	0,92	44.90189	15.6101	161,50
K25	proljeće 2020	8,54	29,93	20,91	6,72	1,15	44.924056	15.61475	161,50
P1	ljeto 2020	7,81	38,15	35,49	4,80	0,92	44.83324	15.55742	217,80
P2	ljeto 2020	8,20	15,80	23,82	2,88	0,69	44.84151	15.59712	217,80

P3	ljeto 2020	8,23	16,75	34,03	4,80	0,69	44.83874	15.56471	217,80
P4	ljeto 2020	8,06	16,33	28,69	3,84	0,92	44.84276	15.59948	217,80
P5	ljeto 2020	7,67	34,05	18,96	4,80	0,92	44.828861	15.613972	217,80
P6	ljeto 2020	8,11	15,39	20,42	4,80	0,92	44.8398	15.6	217,80
P7	ljeto 2020	7,95	15,77	22,85	2,88	0,92	44.84855	15.60314	217,80
P8	ljeto 2020	7,73	36,67	29,17	3,84	0,69	44.859792	15.578872	217,80
P9	ljeto 2020	7,85	16,58	31,60	3,84	0,69	44.853382	15.589129	217,80
P10	ljeto 2020	8,13	16,71	35,49	2,88	0,46	44.84929	15.62626	217,80
P11	ljeto 2020	8,12	16,86	36,22	3,84	0,69	44.87457	15.61264	217,80
P12	ljeto 2020	8,46	16,47	33,06	2,88	0,69	44.91136	15.57643	217,80
P13	ljeto 2020	8,52	16,07	32,82	2,88	0,69	44.90627	15.57911	217,80
P14	ljeto 2020	7,80	36,53	23,82	3,84	0,46	44.90148	15.57403	217,80
P15	ljeto 2020	8,23	15,89	25,28	3,84	0,46	44.903833	15.593583	217,80
P16	ljeto 2020	8,29	21,83	25,04	3,84	0,46	44.90234	15.60834	217,80
P17	ljeto 2020	8,19	16,38	27,96	2,88	0,69	44.78385	15.65708	217,80
P18	ljeto 2020	8,16	16,24	27,96	3,84	2,53	44.76938	15.69103	217,80
MT19	ljeto 2020	8,16	14,58	22,61	2,88	0,92	44.871571	15.596254	217,80
MT20	ljeto 2020	8,21	14,55	21,88	2,88	0,92	44.872169	15.599203	217,80
MT21	ljeto 2020	8,29	13,85	20,18	2,88	0,92	44.87945	15.61344	217,80
MT22	ljeto 2020	8,26	14,00	19,93	2,88	0,92	44.876972	15.613583	217,80
MT23	ljeto 2020	8,27	14,22	22,85	3,84	0,92	44.89443	15.60914	217,80
MT24	ljeto 2020	8,38	13,69	22,85	3,84	0,92	44.90189	15.6101	217,80
K25	ljeto 2020	8,39	24,79	23,34	3,84	0,92	44.924056	15.61475	217,80
P1	zima 2021	8,32	69,50	25,28	3,84	1,84	44.83324	15.55742	90,40
P2	zima 2021	8,37	70,20	28,69	3,84	0,46	44.84151	15.59712	90,40
P3	zima 2021	8,39	78,90	18,96	2,88	0,23	44.83874	15.56471	90,40
P4	zima 2021	8,42	63,20	23,82	3,84	0,92	44.84276	15.59948	90,40
P5	zima 2021	8,38	82,10	9,97	3,84	0,92	44.828861	15.613972	90,40
P6	zima 2021	8,42	82,50	11,43	3,84	0,92	44.8398	15.6	90,40
P7	zima 2021	8,35	56,00	15,56	2,88	0,92	44.84855	15.60314	90,40
P8	zima 2021	8,39	43,50	23,58	2,88	0,23	44.859792	15.578872	90,40
P9	zima 2021	8,30	69,70	25,53	4,80	0,46	44.853382	15.589129	90,40
P10	zima 2021	8,51	60,90	29,90	3,84	0,23	44.84929	15.62626	90,40
P11	zima 2021	8,00	60,90	29,90	3,84	0,23	44.87457	15.61264	90,40
P12	zima 2021	8,27	66,50	26,25	3,84	1,61	44.91136	15.57643	90,40
P13	zima 2021	8,20	66,80	26,25	2,88	0,23	44.90627	15.57911	90,40
P14	zima 2021	8,05	69,90	17,99	3,84	0,23	44.90148	15.57403	90,40
P15	zima 2021	8,04	61,70	18,72	3,84	0,23	44.903833	15.593583	90,40
P16	zima 2021	8,01	69,70	18,48	3,84	0,23	44.90234	15.60834	90,40
P17	zima 2021	8,44	78,20	8,99	3,84	1,38	44.78385	15.65708	90,40
P18	zima 2021	8,50	85,30	17,50	3,84	2,76	44.76938	15.69103	90,40
MT19	zima 2021	8,34	61,70	14,59	3,84	0,92	44.871571	15.596254	90,40
MT20	zima 2021	8,32	60,90	14,59	3,84	0,92	44.872169	15.599203	90,40

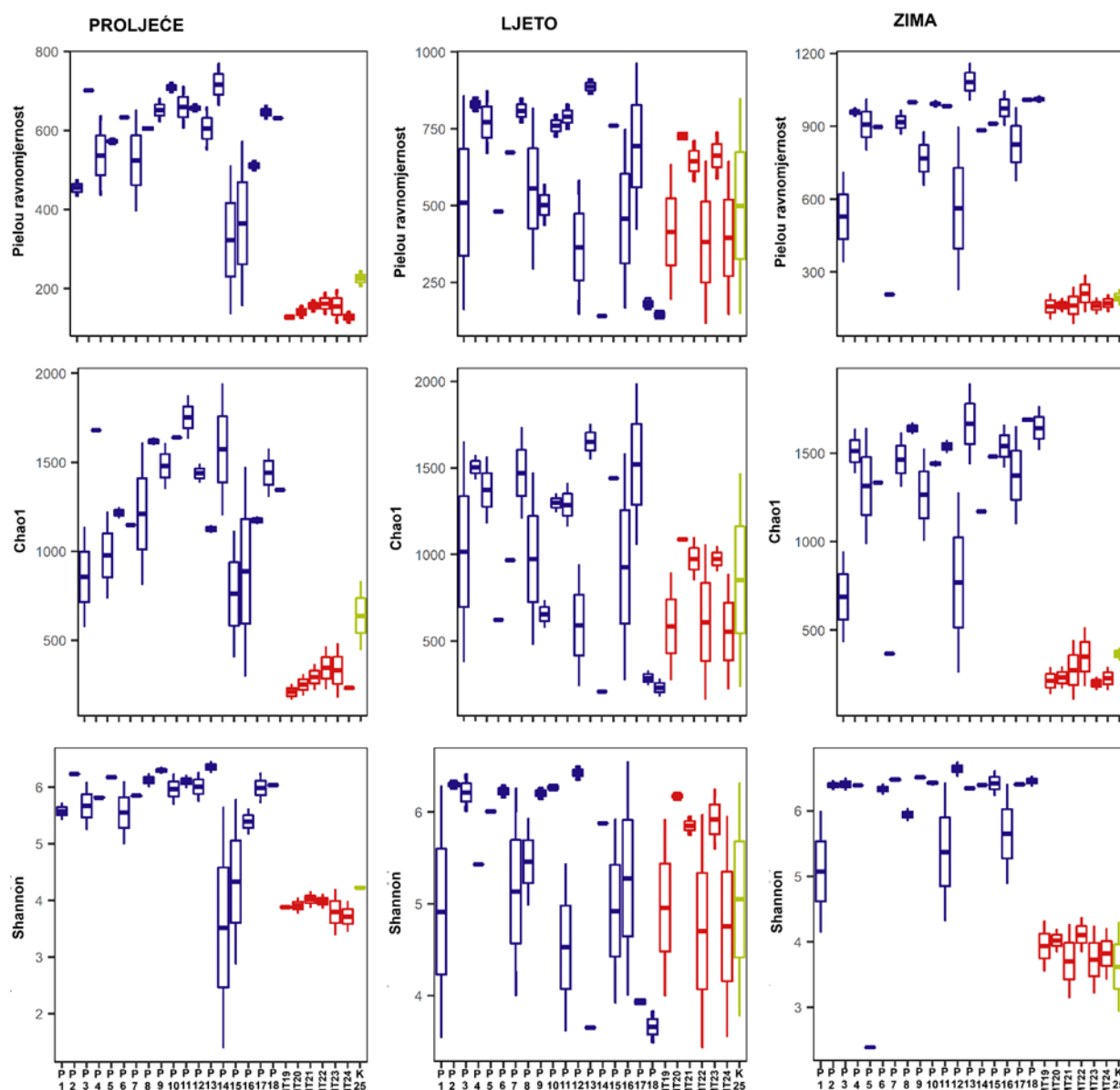
MT21	zima 2021	8,26	63,90	15,07	3,84	0,92	44.87945	15.61344	90,40
MT22	zima 2021	8,28	62,90	14,83	3,84	0,92	44.876972	15.613583	90,40
MT23	zima 2021	8,02	60,90	17,26	2,88	0,69	44.89443	15.60914	90,40
MT24	zima 2021	8,53	55,50	17,26	2,88	0,69	44.90189	15.6101	90,40
K25	zima 2021	7,90	64,50	17,26	3,84	0,69	44.924056	15.61475	90,40



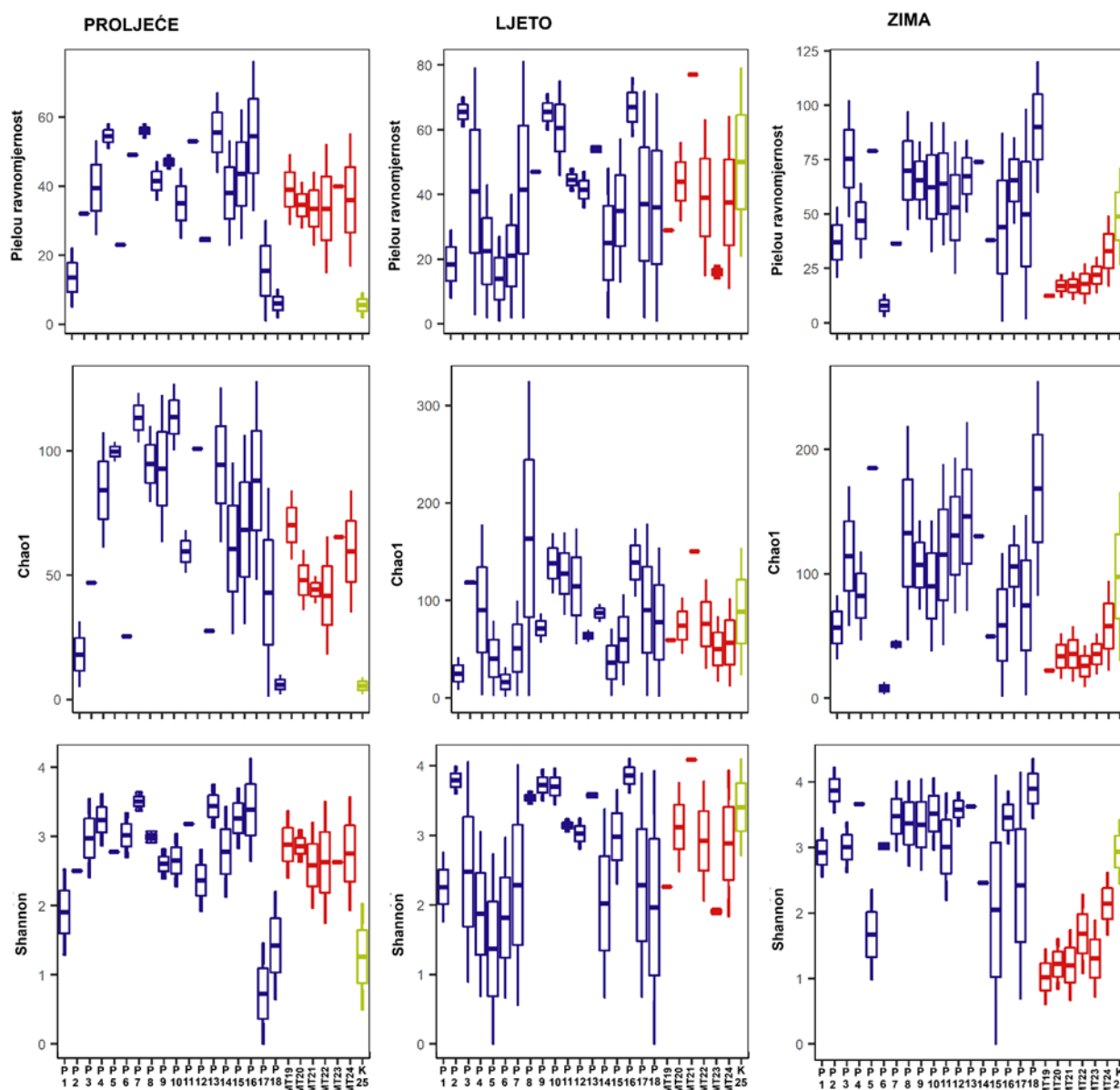
Dodatna slika 3. Pearsonov koeficijent korelacije okolišnih parametara izmjerenih u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera.



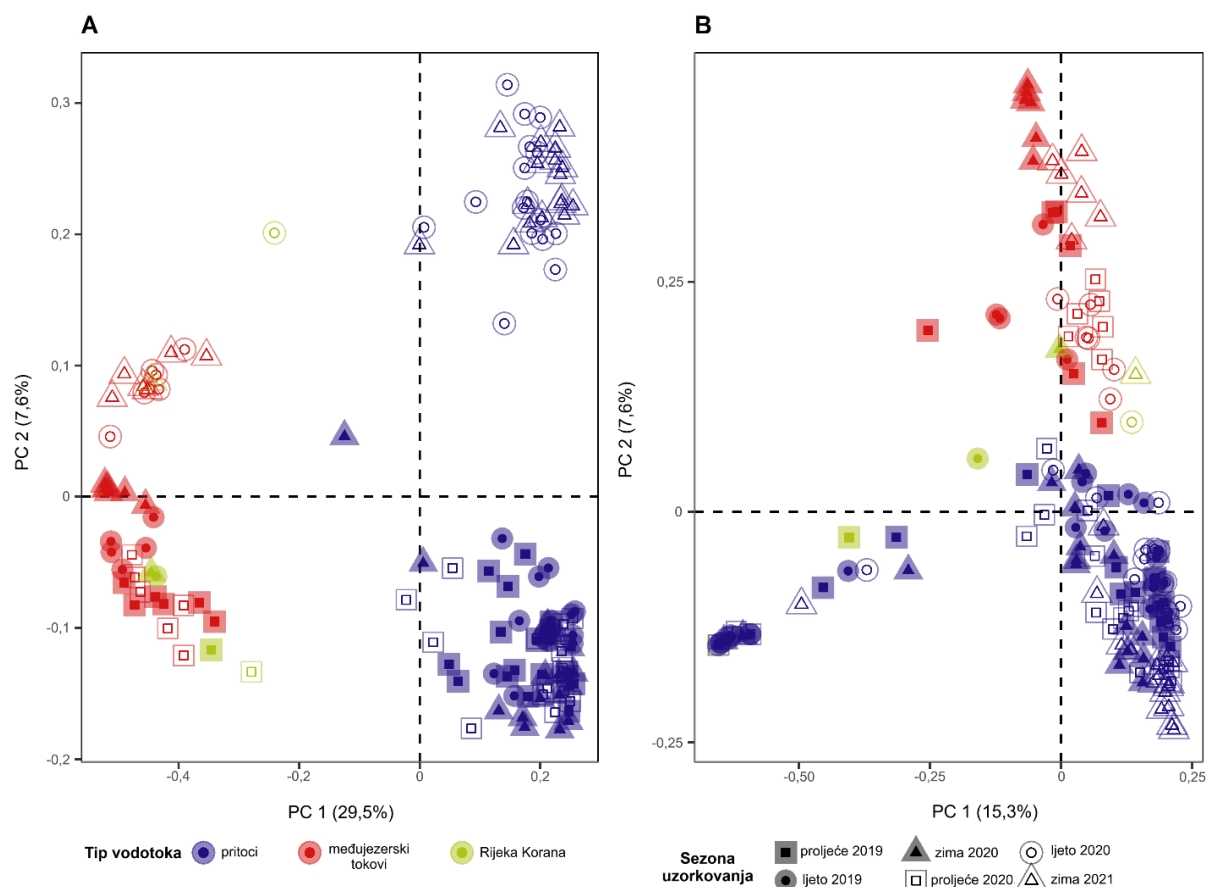
Dodatna slika 4. PCA ordinacija okolišnih parametara izmjerenih tijekom istraženog razdoblja. Različite boje predstavljaju sezone uzorkovanja, a oblici različite vrste vodotoka.



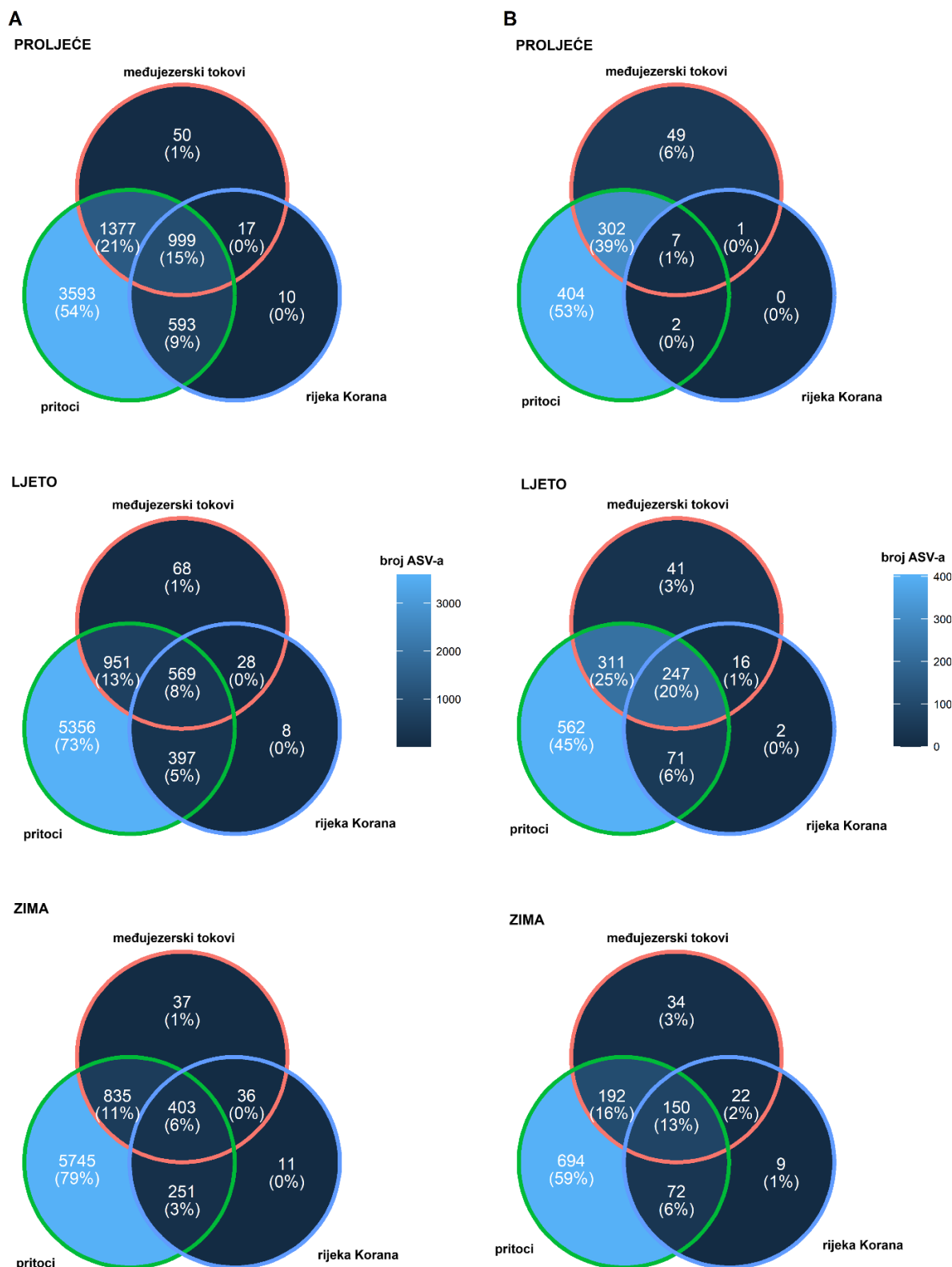
Dodatna slika 5. Alfa raznolikost prokariotskih zajednica na 25 lokacija u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera određena indeksima za ravnomjernost prema Pielou, brojnost prema Chao1 i raznolikost prema Shannonu. Indeksi su izračunati za svaku sezonu uzorkovanja. Različite boje označuju uzorkovane vodotoke (plavo – pritoci, crveno – međujezerski potoci, žuto – rijeka Korana). Kratice uzoraka odnose se na različita mjesta uzorkovanja.



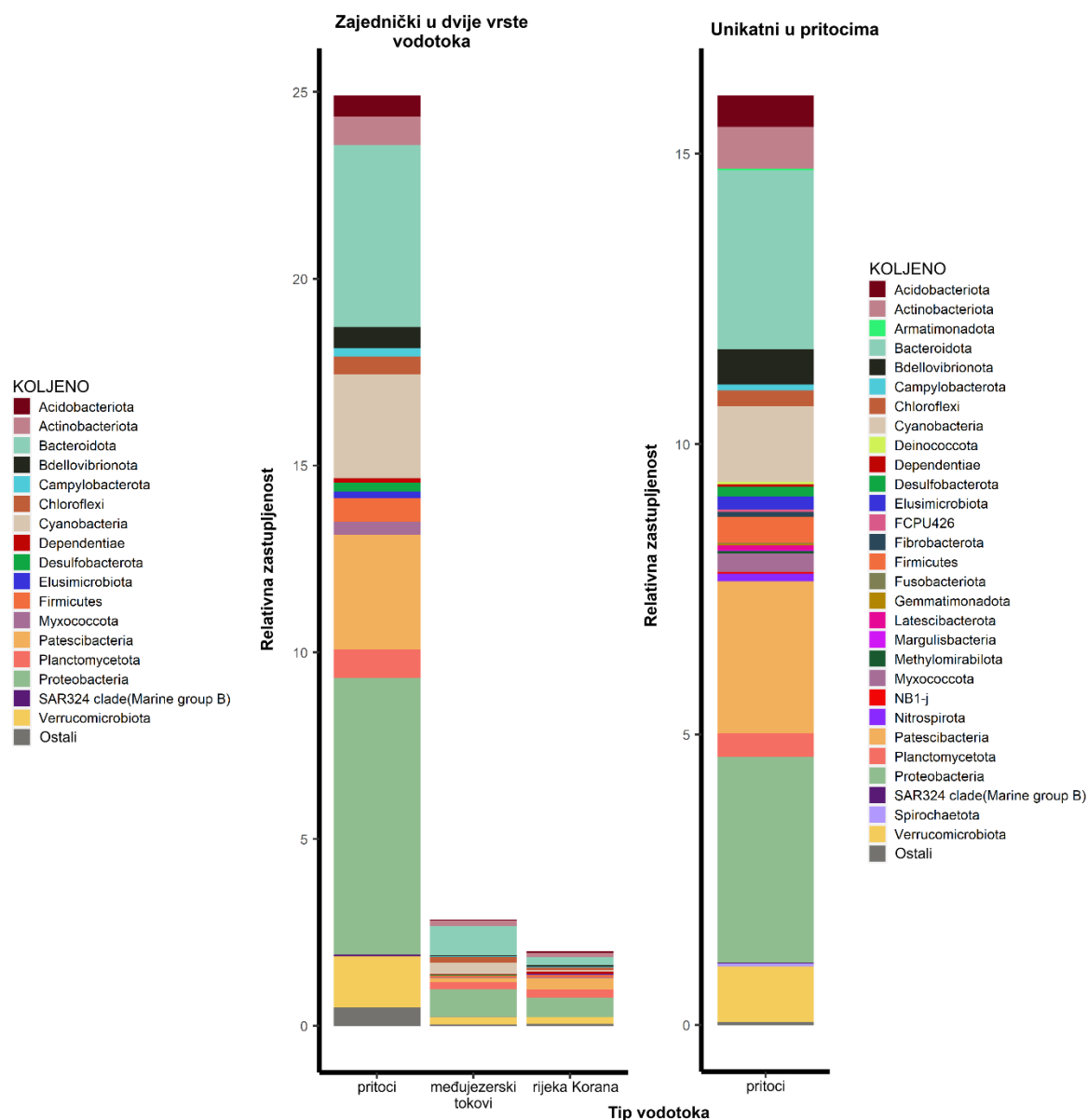
Dodatna slika 6. Alfa raznolikost gljivičnih zajednica na 25 lokacija u slatkovodnom povezanom ekosustavu Plitvičkih jezera određena indeksima za ravnomjernost prema Pielou, brojnost prema Chao1 i raznolikost prema Shannonu. Indeksi su izračunati za svaku sezonu uzorkovanja. Različite boje označuju uzorkovane vodotoke (plavo – pritoci, crveno – međujezerski potoci, žuto – rijeka Korana). Kratice uzoraka odnose se na različita mjesta uzorkovanja.



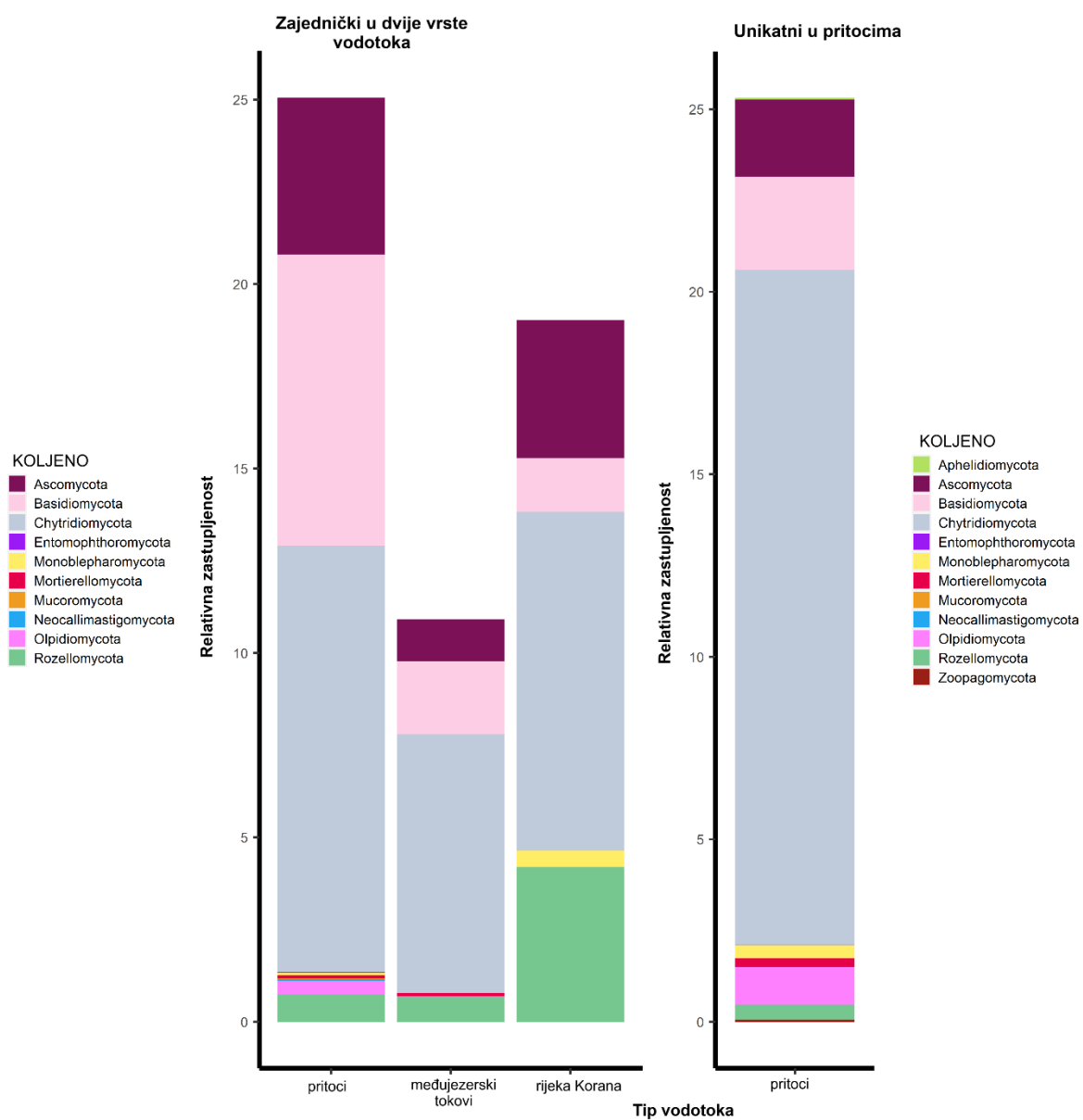
Dodatna slika 7. PCoA bakterijskih (A) i gljivičnih (B) zajednica β raznolikosti na temelju Bray-Curtisove različitosti. Utjecaj različitih vrsta vodotoka i sezone uzorkovanja na klasteriranje uzoraka testiran je permutacijskom multivarijantnom analizom varijance (PERMANOVA). Različite boje predstavljaju vrste vodotoka, a različiti oblici predstavljaju sezone uzorkovanja.



Dodatna slika 8. Vennov dijagram koji predstavlja broj zajedničkih i jedinstvenih bakterijskih (A) i gljivičnih (B) ASV između tri različite vrste potoka, pritoka (zeleno), međujezerskih potoka (crveno) i rijeke Korane (plavo). Dijagrami su podijeljeni po sezoni uzorkovanja.



Dodatna slika 9. Relativna zastupljenost prokariotskih zajednica u dvije vrste vodotoka i unikatnih u pritocima. Označene boje predstavljaju koljena.

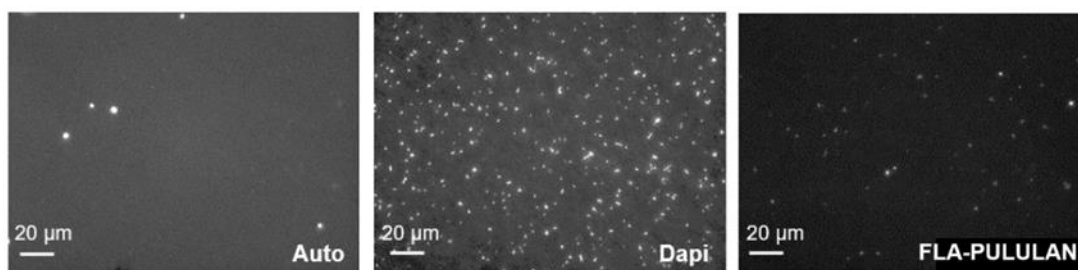


Dodatna slika 10. Relativna zastupljenost gljivičnih zajednica u dvije vrste vodotoka i unikatnih u pritocima. Označene boje predstavljaju koljena.

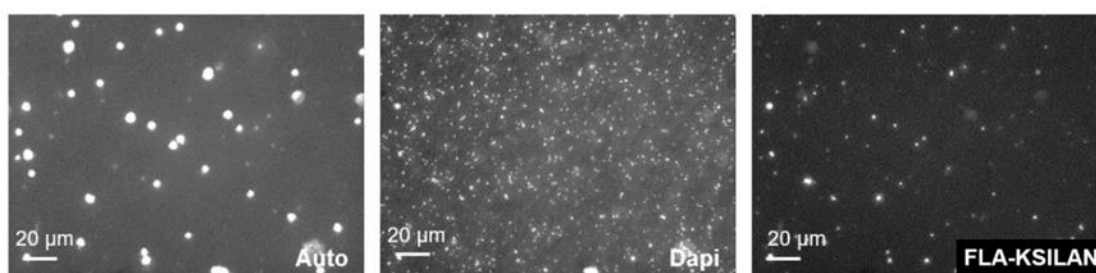
Dodatna tablica 4. Okolišni parametri izmjereni u jezerima Kozjak i Crniševo.

Jezero	Sezona uzorkovanja	Ca ²⁺ mg L ⁻¹	Mg ²⁺ mg L ⁻¹	Na ⁺ mg L ⁻¹	Cl ⁻ mg L ⁻¹	SO ₄ ²⁻ mg L ⁻¹	NO ₃ ⁻ mg L ⁻¹	Konduktivitet	Salinitet	pH
Crniševo	Proljeće	149,10	39,17	271,74	465,81	83,77	1,66	1155,49	0,83	8,21
Crniševo	Ljeto	99,45	32,93	223,92	383,57	84,01	1,41	1502,79	0,93	8,21
Crniševo	Zima	99,45	32,93	223,92	383,57	84,01	1,41	969,74	0,72	8,03
Kozjak	Proljeće	69,84	24,06	1,04	2,21	3,19	1,71	264,09	0,18	8,36
Kozjak	Ljeto	58,02	23,63	0,90	1,56	3,28	1,66	306,87	0,17	8,11
Kozjak	Zima	70,84	21,93	0,97	1,73	2,42	2,60	229,30	0,18	8,30

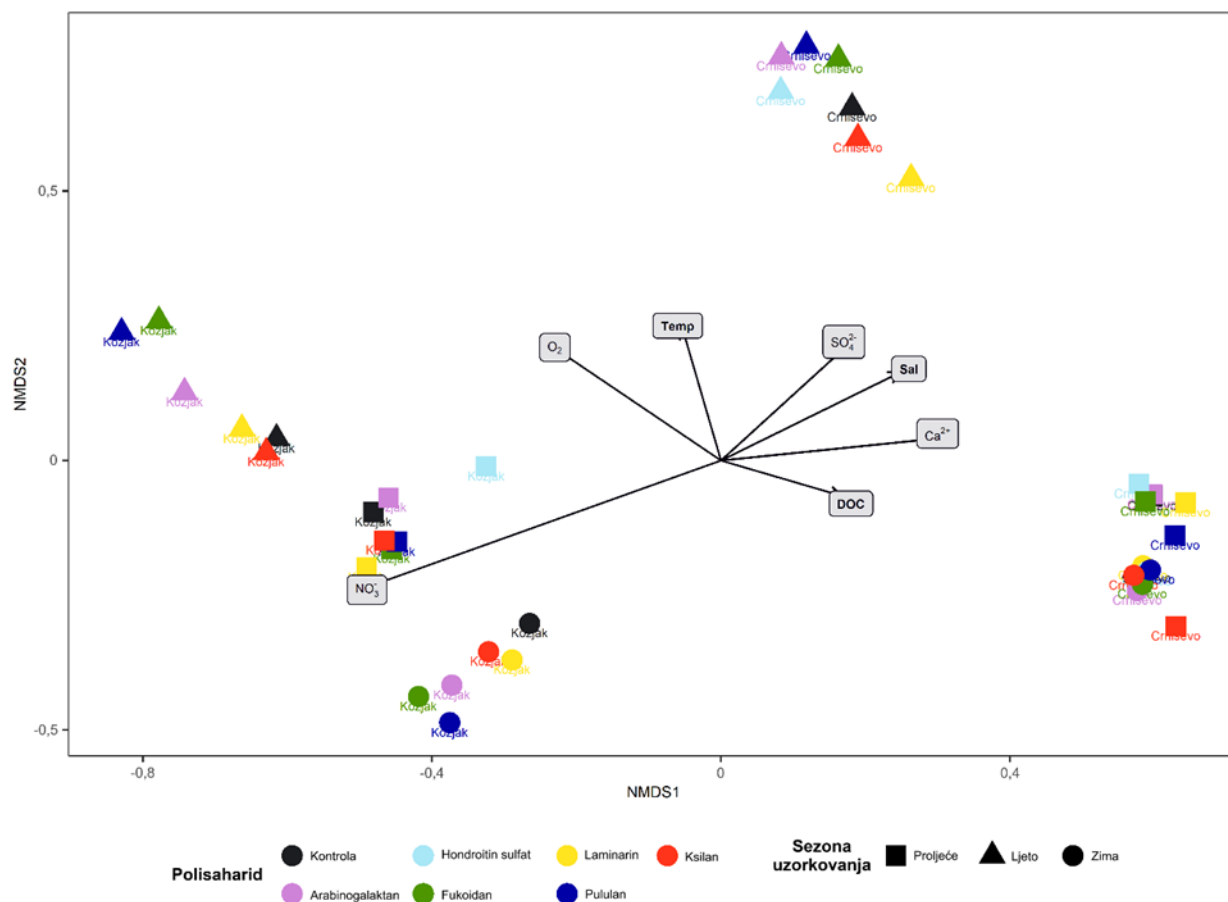
A



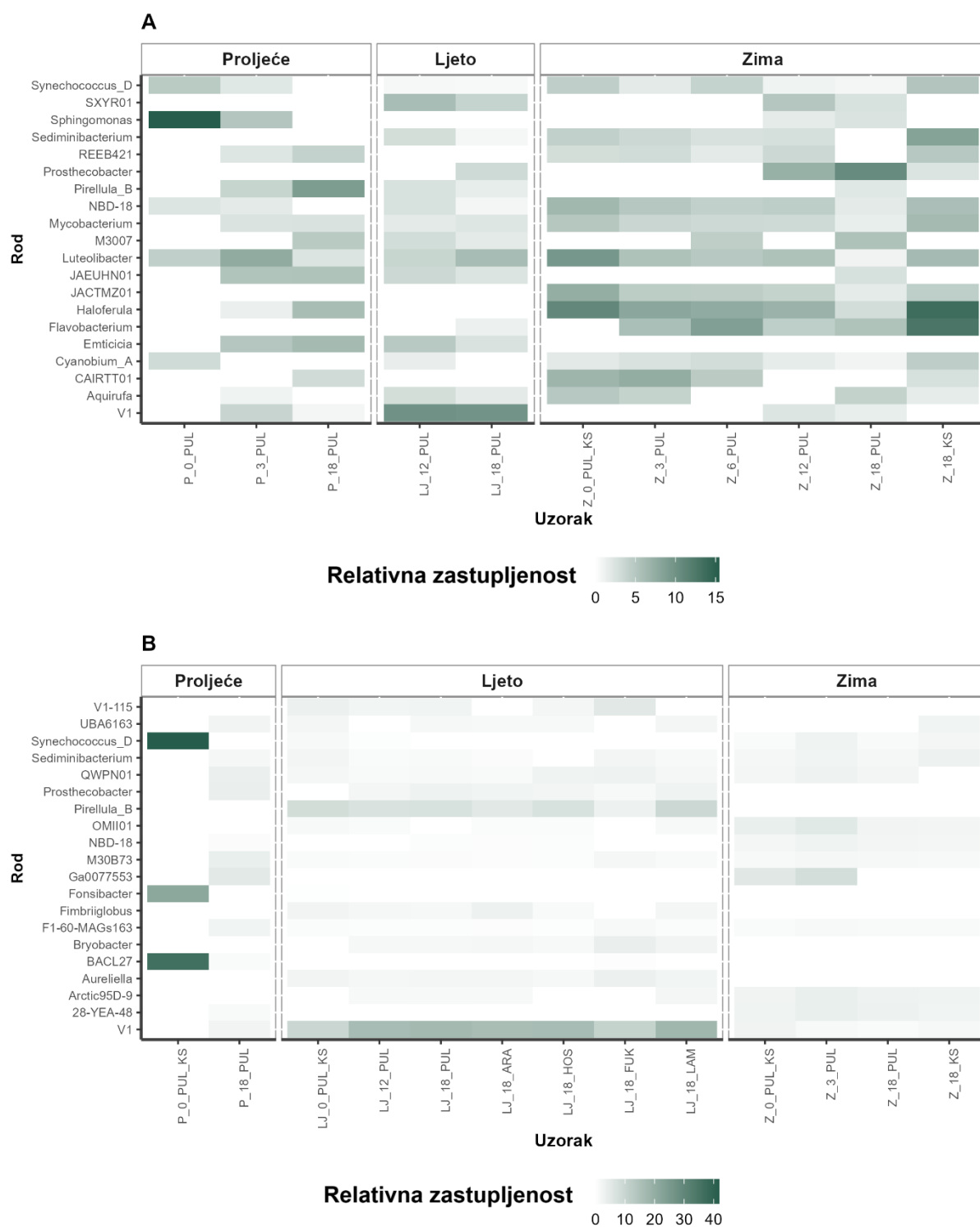
B



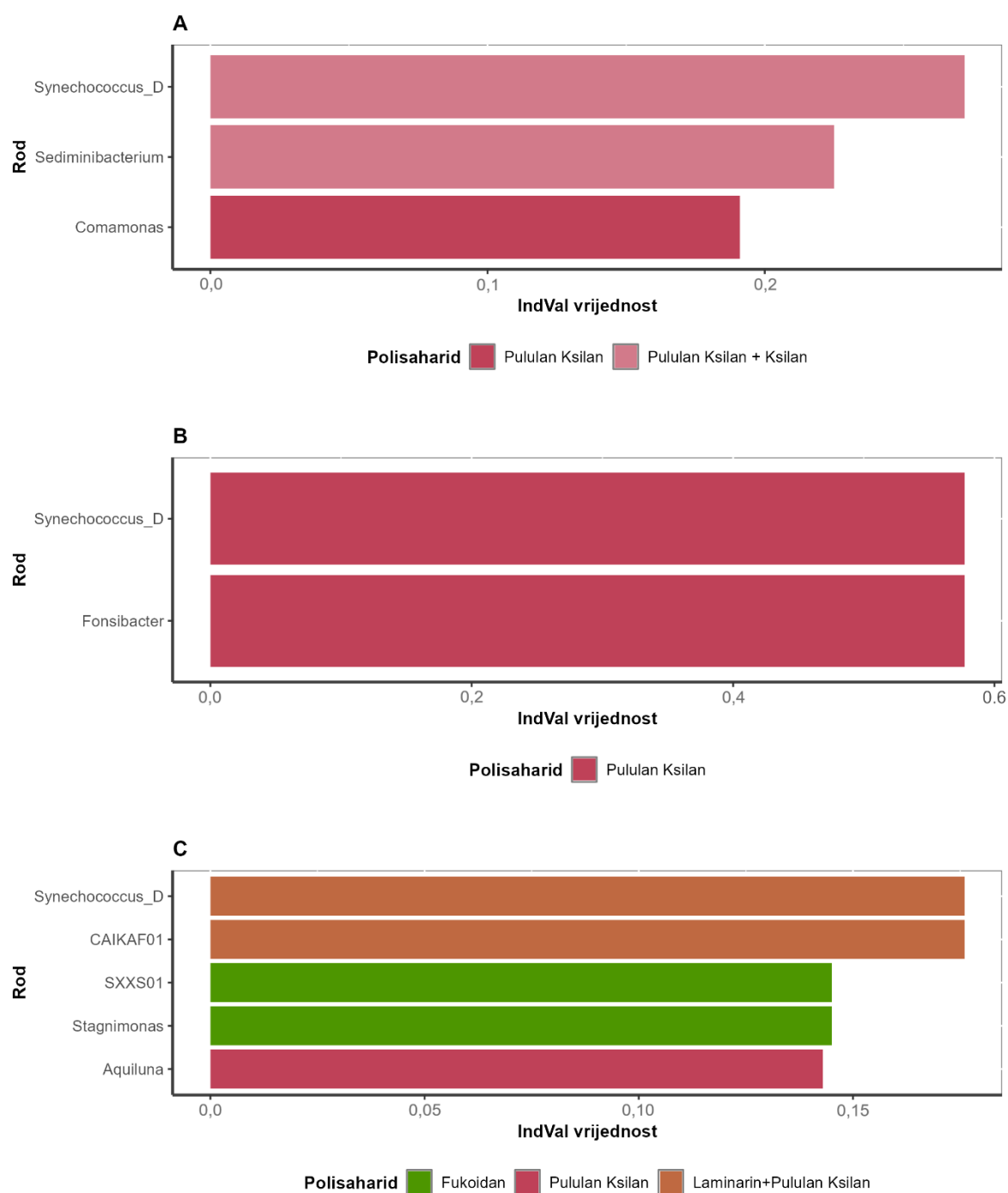
Dodatna slika 11. Automatizirane mikroskopske slike stanica obojenih DAPI i FLA-pululanom u zimi Kozjak 3. dan (A) i DAPI i FLA-ksilanom u zimi Crniševo 6. dan (B) snimljene na auto, DAPI i FLAP signal.



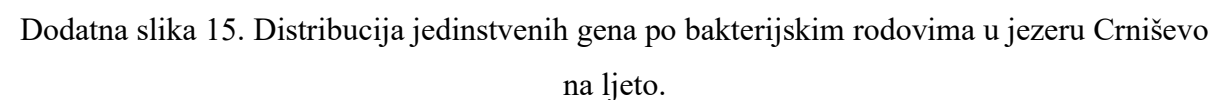
Dodatna slika 12. NMDS ordinacija koja pokazuje Bray-Curtisovu različitost u sastavu mikrobne zajednice preko jezera (Kozjak i Crniševo) i utjecaj okolišnih parametara na njen sastav. Dodani polisaharidi u inkubacije označeni su bojama, a sezone uzorkovanja različitim oblicima.



Dodatna slika 13. Relativna zastupljenost ukupne strukture bakterijske zajednice (razina rod) u jezerima Kozjak (A) i Crniševu (B), podijeljena po sezonama uzorkovanja. Kratice uzoraka odnose se na inkubacije s različitim polisaharidima i dan inkubacije.



Dodatna slika 14. Rezultati IndVal analize s identificiranim rodovima bakterija značajno povezanih s određenim polisaharidima u zimskim inkubacijama u jezeru Kozjak (A) i proljetnim (B) i ljetnim (C) inkubacijama u jezeru Crniševo.



§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime	Andrea Čačković
Datum i mjesto rođenja	27.10.1994., Zagreb, Hrvatska
E-mail adresa	andreacackovic@gmail.com

Obrazovanje

2021 – danas	Doktorski studij kemije – smjer Biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
2013 – 2018	Sveučilišni integrirani prijediplomski i diplomski studij Biologija i Kemija, Biološki odsjek, Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb Naslov diplomskog rada: <i>Nanostrukturalna karakterizacija stanica morskih dijatomeja izloženih kadmiju</i> , pod vodstvom dr.sc. Tea Mišić Radić i izv.prof.dr.sc. Zrinka Ljubešić
2009 – 2013	Gimnazija Lucijana Vranjanina, Zagreb

Radno iskustvo

2020 – danas	Institut Ruđer Bošković, Zavod za kemiju materijala, Laboratorij za processe taloženja, asistent
svibanj 2024	Znanstvena ekspedicija Atlantic Explorer AE2413 - <i>Pritisak na prokariote</i> , Član znanstvenog tima
kolovoz 2023 – veljača 2024	Sveučilište u Bremenu, Grupa interakcija mikrob-ugljikohidrat, Njemačka, gost istraživač
svibanj 2023 – veljača 2024	Institut Max Planck za morsku mikrobiologiju, Odjel za molekularnu ekologiju, Bremen, Njemačka, gost istraživač
2019 – 2020	Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za fizičku kemiju tragova, stručni suradnik
ožujak 2018	Osnovna škola Kajzerica, Zagreb, profesor prirode i biologije

Stipendije

2024	ISME19 TravelGrant
2023	Early career Researcher Meeting Grant
2023	FEMS Research and Training Grant, 3-mjesečno istraživanje
2023	DAAD scholarship, Research Grants–Short-TermGrants, 6-mjesečno istraživanje

Stručne funkcije i angažman

2024 – danas	Predsjednica Vijeća asistenata, Institut Ruđer Bošković
2024 – danas	Predstavница asistenata Zavoda za kemiju materijala u Vijeću asistenata
2022 – 2023	Predstavница asistenata u Vijeću Zavoda za kemiju materijala

Projekti

2024 – danas	Interreg Italija-Hrvatska 2021-2027, Projekt ACTION - <i>Increasing coastal ecosystem resilience to climate change</i> (Sandi Orlić)
2022 – danas	Horizon Europe programme, Danube4all – „ <i>Danube river basin lighthouse – restoration of fresh and transitional water ecosystems</i> “ (Sandi Orlić)
2021 – 2023	Europski fond za regionalni razvoj, IRI2, <i>Razvoj testa temeljenog na nukleinskim kiselinama za identifikaciju vrsta indikatora kakvoće vode</i> (Sandi Orlić)
2020 – 2024	Hrvatska zaklada za znanost, <i>Utjecaj klimatskih promjena na bioraznolikost koralja - istraživanje događaja masovnog mortaliteta u Jadranskom moru</i> – ADRICOR (Petar Kružić)
2020 – 2022	Interreg Mediterranean transnational cooperation programme 2014-2020, BLUE BIO MED - <i>Mediterranean Innovation Alliance for sustainable blue economy</i> (Sandi Orlić)
2020 – 2021	<i>Praćenje mikrobne razgradnje organske tvari u ekosustavu Plitvičkih jezera</i> (Sandi Orlić)
2017 – 2018	International Visegrad Fund, <i>Algal cell biophysical properties as markers for environmental stress in aquatic systems</i> (Nadica Ivošević DeNardis)

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019	Otvoreni dani Instituta Ruđer Bošković, Zagreb
2019	Scientific workshop within the ERASMUS+ project „The magic of water“, koordinator radionice „Marine microworld – phytoplankton“
2019	STEM. RASTEM. ISTRAŽUJEM: Morski mikrosvijet - fitoplankton
2015 – 2018	Noć biologije i Otvoreni dani Kemijskog odsjeka, Otvoreni dani Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

Znanstveni radovi u časopisima

1. Čačković, Andrea; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi; Reintjes, Greta
Selective heterotrophic bacteria can selfishly process polysaccharides in freshwater lakes
// Cell Reports, 115415 (2025), doi:10.1016/j.celrep.2025.115415
2. Mitrović, Maja; Čačković, Andrea; Selak, Lorena; Marković, Tamara; Orlić, Sandi
A Preliminary Study on the Eukaryotic Microbial Diversity in Croatian Geothermal Waters // Water, 17 (2025), 4; 541-16. doi: 10.3390/w17040541
3. Mišić Radić, Tea; Vukosav, Petra; Čačković, Andrea; Dulebo, Alexander
Insights into the Morphology and Surface Properties of Microalgae at the Nanoscale by Atomic Force Microscopy (AFM): A Review // Water, 15 (2023), 1983, 21. doi: 10.3390/w15111983
4. Čačković, Andrea; Kajan, Katarina; Selak, Lorena; Marković, Tamara; Brozinčević, Andrijana; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi
Hydrochemical and Seasonally Conditioned Changes of Microbial Communities in the Tufa-Forming Freshwater Network Ecosystem // mSphere, 8 (2023), 3; e00602-22, 17. doi: 10.1128/msphere.00602-22
5. Mišić Radić, Tea; Vukosav, Petra; Komazec, Bruno; Formosa-Dague, Cécile; Domazet Jurašin, Darija; Peharec Štefanić, Petra; Čačković, Andrea; Jurać, Krunoslav; Ivošević DeNardis, Nadica
Nanoplastic-Induced Nanostructural, Nanomechanical, and Antioxidant Response of Marine Diatom *Cylindrotheca closterium* // Water, 14 (2022), 14; 2163, 22. doi: 10.3390/w14142163
6. Novosel, Nives; Mišić Radić, Tea; Zemla, Joanna; Lekka, Malgorzata; Čačković, Andrea; Kasum, Damir; Legović, Tarzan; Žutinić, Petar; Gligora Udovič, Marija; Ivošević DeNardis, Nadica

Temperature-induced response in algal cell surface properties and behaviour: an experimental approach // Journal of applied phycology, 34 (2022), 243-259. doi: 10.1007/s10811-021-02591-0

7. Mišić Radić, Tea; Čačković, Andrea; Penezić, Abra; Dautović, Jelena; Lončar, Jovica; Omanović, Dario; Jurać, Krunoslav; Ljubešić, Zrinka

Physiological and morphological response of marine diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae) exposed to cadmium // European journal of phycology, 56 (2021), 1; 24-36. doi: 10.1080/09670262.2020.1758347

Priopćenja na znanstvenim skupovima

1. Čačković, Andrea; Selak, Lorena; Kajan, Katarina; Marković, Tamara; Brozinčević, Andrijana; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi. Stability of the freshwater network ecosystem despite seasonal and downstream changes in environmental conditions and diversity of microbial communities // 7th Faculty of science PhD student symposium : Book of Abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023. str. 87-87
2. Čačković, Andrea; Brozinčević, Andrijana; Orlić, Sandi. Diversity and Seasonal Variation of Microbial Communities in Karst Stream Tufa Deposits // 17th Symposium on Aquatic Microbial Ecology SAME17 "From isolation to collaboration": Abstract Book / SAME17 Organizing Committee (ur.). Tartu, Estonija: University of Tartu Press, 2023. str. 74-74
3. Čačković, Andrea; Kajan, Katarina; Mitrović, Maja; Selak, Lorena; Brozinčević, Andrijana; Orlić, Sandi. Bacterial diversity of Plitvice Lakes catchment area during the summer season // FEMS Conference on Microbiology : Electronic abstract book. Beograd, 2022. str. 607-607
4. Čačković, Andrea; Ankon, Pavel; Kružić, Petar; Orlić, Sandi. Relationship status: it's complicated - the love story of corals and microbes // Zbornik sažetaka 14. hrvatskog biološkog kongresa = Book of abstracts of the 14th Croatian biological congress. Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2022. str. 152-153
5. Čačković, Andrea ; Kajan, Katarina ; Mitrović, Maja ; Selak, Lorena ; Brozinčević, Andrijana ; Orlić, Sandi. Seasonal changes of microbial community in Plitvice Lakes //

6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD student symposium : book of abstracts. Zagreb, 2022. str. 256-257
6. Čačković, Andrea; Selak, Lorena; Kajan, Katarina; Mitrović, Maja; Marković, Tamara; Brozinčević, Andrijana; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi. The spatial-seasonal differences of microbial communities in the freshwater network ecosystem // 18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18). Lausanne, Švicarska, 2022
7. Mišić Radić, Tea; Vukosav, Petra; Komazec, Bruno; Formosa-Dague, Cecile; Domazet Jurašin, Darija; Peharec Štefanić, Petra; Čačković, Andrea; Jurać, Krunoslav; Ivošević DeNardis, Nadica. Nanoplastics and microalgae: nanostructural, nanomechanical, and antioxidant response of marine diatom *Cylindrotheca closterium* // Book of abstracts: 10th Regional Biophysics Conference & 15th International Summer School of Biophysics / Dolanski Babić, Sanja; Dutour Sikirić, Maja; Stepanić, Višnja et al. (ur.). Split: Hrvatsko Biofizičko Društvo, 2024. str. 29-29
8. Selak, Lorena; Marković, Tamara; Čačković, Andrea; Mitrović, Maja; Orlić, Sandi. Sun is shining, salinity is rising, are microbes responding? 2022. str. 1-1
9. Kružić, Petar; Gračan, Romana; Lipej, Lovrenc; Mavrič, Borut; Ankon, Pavel; Čačković, Andrea; Prohaska, Ana. Utjecaj marikulture na bentos uz otok Rava. dvadeset godina istraživanja // Zbornik sažetaka 14. hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem = Book of abstracts of the 14th Croatian biological congress with International Participation. Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2022. str. 43-44
10. Stanić, Ivana; Selak, Lorena; Kajan, Katarina ; Čačković, Andrea ; Brozinčević, Andrijana ; Orlić, Sandi. Microbial community comparison of two lake systems in Croatia // 6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD student symposium : book of abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 224-225
11. Kružić, Petar ; Gračan, Romana ; Lipej, Lovrenc ; Mavrič, Borut ; Ankon, Pavel ; Čačković, Andrea. Klimatske promjene i stanje crvene gorgonije (*Paramuricea clavata* (Risso, 1826)) u zaštićenim područjima istočnog Jadrana // Zbornik sažetaka 14. hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem = Book of abstracts of the 14th Croatian biological congress with International Participation. Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2022. str. 42-43

12. Novosel, Nives ; Mišić Radić, Tea ; Zemla, Joanna ; Lekka, Malgorzata ; Čačković, Andrea ; Žutinić, Petar ; Gligora Udovič, Marija ; Ivošević DeNardis, Nadica. Does temperature induce response in algal cell surface properties and behaviour? // 35th Congress of the International Society of Limnology : Book of abstracts. 2021. str. ---
13. Novosel, Nives ; Mišić Radić, Tea ; Zemla, Joanna ; Lekka, Malgorzata ; Čačković, Andrea ; Kasum, Damir ; Legović, Tarzan ; Žutinić, Petar ; Gligora Udovič, Marija ; Ivošević DeNardis, Nadica. Temperature alterations cause change in algal cell surface properties and behaviour // ASLO 2021 Aquatic Sciences Meeting. 2021. str. 1-1
14. Mišić Radić, Tea; Čačković, Andrea; Novosel, Nives; Ivošević DeNardis, Nadica. Impact of environmental stress on marine diatoms: insight from AFM study // ASLO 2021 Aquatic Sciences Meeting. ASLO, 2021, 1, 1
15. Mišić Radić, Tea ; Vukosav, Petra; Čačković, Andrea. Nanoplastics in the marine environment: effect of microalgal extracellular polymers studied by AFM // Microscopy Conference 2021 Joint Meeting of Dreiländertagung & Multinational Congress on Microscopy : Proceedings. 2021. str. 304-304
16. Mišić Radić, Tea; Čačković, Andrea. Algal cells under heavy metal stress: physiological and morphological response // Molecular Biophysics: ABC of the puzzle of Life, 3rd COST Action Plenary Meeting CA 15126. 2019. str. 109-110
17. Mišić Radić, Tea ; Čačković, Andrea. Algal cells under environmental stress: physiological and morphological response // 9th AFM BioMed Conference. Münster, 2019. str. 138-138
18. Stanić, Ivana; Čačković, Andrea; Orlić, Sandi. Diversity of microeukaryotes in different lakes in Croatia // 15th European Diatom Meeting. Ohrid, Sjeverna Makedonija, 07.05.2024-09.05.2024
19. Stanić, Ivana; Selak, Lorena; Kajan, Katarina; Čačković, Andrea; Pjevac, Petra; Orlić, Sandi. Distribution of methanotrophs along the oxycline in two lake systems // 18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18). Lausanne, Švicarska, 2022
20. Novosel, Nives; Mišić Radić, Tea; Zemla, Joanna; Lekka, Malgorzata; Čačković, Andrea; Kasum, Damir; Legović, Tarzan; Žutinić, Petar; Gligora Udovič, Marija; Ivošević DeNardis, Nadica. Algal cell adaptation responses under influence of single stressor, 2021