UČINAK KVALITETE BAKTERIJSKOG PLIJENA RODA Limnohabitans NA RAST ZAJEDNICA HETEROTROFNIH BIČAŠA

Grujčić, Vesna

Master's thesis / Diplomski rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:371172

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski znanstveni studij biologije

Vesna Grujčić

UČINAK KVALITETE BAKTERIJSKOG PLIJENA RODA *Limnohabitans*

NA RAST ZAJEDNICA HETEROTROFNIH BIČAŠA

Diplomski rad

Osijek, 2012.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski znanstveni studij biologije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Diplomski rad

UČINAK KVALITETE BAKTERIJSKOG PLIJENA RODA *Limnohabitans* NA RAST ZAJEDNICA HETEROTROFNIH BIČAŠA

Vesna Grujčić

Rad je izrađen: 2012. g. na odjelu za Mikrobijalnu ekolgiju voda, Hidrobiološki institut, České Budějovice
Mentor: doc.dr.sc. Goran Palijan
Neposredni voditelj: prof.dr.sc. Karel Šimek

Kratak sažetak diplomskog rada:

Različiti bakterijski sojevi mogu imati različitu nutritivnu vrijednost za heterotrofne bičaše i prema tome moduliraju rast heterotrofnih bičaša i vjerovatno sastav zajednica. Ispitivan je utjecaj nutritivne kvalitete tri bakterijska soja roda *Limnohabitans* na rast (stopa rasta, dužina lag faze) zajednica heterotrofnih bičaša. Zabilježena je i različita raspodjela volumena heterotrofnih bičaša u različitim vremenskim fazama eksperimenta. Sva tri testirana soja pokazala su se kao značajna za rast zajednica heterotrofnih bičaša no soj T6 (neopisani soj iz roda *Limnohabitans*) se istaknuo kao najbolji jer pokazuje najkraću lag-fazu i najveću stopu rasta. Podatci o raspodjeli veličina heterotrfonih bičaša pokazali su kako tijekom ranih faza eksperimenta dominiraju bičaši manjeg volumena što se kako je eksperiment odmicao pomicalo prema onima većega volumena, što vjerovatno ukazuje na to da postoji snažan utjecaj specifičnog plijena ili srodnih bakterija na sastav zajednica heterotrofnih bičaša ali nema direktnih dokaza za tu tvrdnju. Rezultati ovoga rada pružaju uvid u saznanja o tome koje bakterijske vrste sudjelu u prijenosu ugljika prema hranidbenom lancu grejzera u određenim vodenim ekosustavima.

Broj stranica: 81
Broj slika: 28
Broj tablica: 17
Broj literaturnih navoda: 36
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Limnohabitans*, zajednice heterotrofnih bičaša, nutritivna kvaliteta bakterija, rast heterotrofnih bičaša
Datum obrane: 27.3.2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Doc.dr.sc. Goran Palijan, mentor
2. Doc.dr.sc. Melita Mihaljević, predsjednik komisije
3. Doc.dr.sc. Ivna Štolf, član komisije
4.Doc.dr.sc. Dubravka Čerba, zamjena člana komisije

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Josip Juraj Strossmayer in Osijek MS thesis
Department of Biology
Graduate Study of Biology
Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

NUTRITIVE EFFECT OF BACTERIA FROM GENUS *Limnohabitans* ON GROWTH OF NATURAL HETEROTROPHIC FLAGELLATE COMMUNITIES

Vesna Grujčić

Thesis performed: 2012 at the Department of Aquatic Microbial Ecology, Institut of Hidrobiology, České Budějovice
Supervisor: Doc.dr.sc. Goran Palijan
Assistant in charge: Prof. dr.sc. Karel Šimek

Short abstract:

Different bacteria strains can have different value as a food for heterotrophic nanoflagellates (HNF), thus modulating HNF growth and probably community composition. It was examined how a prey food quality, of three bacterial strains from genus *Limnohabitans* effects on growth of HNF communities (growth rate, lenght of lag phase). There was a different volume distribution of heterotrophic nanoflagellates in different time-course stages of the experiment. All three tested strains demonstrated significant growth of HNF communities, but strain T6 (undescribed strain of genus *Limnohabitans*) is singeld out as the best because it shows the shortest lag-phase and the biggest growth rate during the experiment. Data on size distribution of HNF showed time-course shift of communities, from smaller flagellates that were dominant during the begining of the experiment, to the bigger ones in the last stages of the experiments.This probably indicates that there is prey-specific effect of bacteria on HNF community composition but without any direct evidence supporting this theory. The results of this work show important insight regarding the question which bacteria strains are active in carbon transfer to the grazer food chain.

Number of pages: 81
Number of figures: 28
Number of tables: 17
Number of references: 36
Original in: Croatian

Key words: *Limnohabitans*, flagellate community, food quality of bacteria, flagellate growth

Date of the thesis defence:

Reviewers:

Thesis deposited in: Library of the Department of Biology, University of J.J. Strossmayer in Osijek

Sadržaj

1. UVOD 7

1.1. Podjela planktona 1

1.1.1. Bakterioplankton 2

1.2. Ciklus ugljika 3

1.3. Mikrobijalna petlja 4

1.3.1. Otopljena organska tvar – DOM 5

1.3.2. Biološke interakcije unutar mikrobijalne petlje 5

1.3.3. Faktori koji kontroliraju mikrobijanu petlju 7

1.3.4. Ekološki značaj i važnost mikrobijalne petlje 7

1.4. Opće karakteristike roda *Limnohabitans* 8

1.4.1. *Limnohabitans curvus* 9

1.4.2. *Limnohabitans parvus* 9

1.4.3. *Limnohabitans planktonicus* 9

1.4.4. *Limnohabitans australis* 10

1.5. Opće karakteristike heterotrofnih bičaša 10

1.5.1. Podjela heterotrofnih bičaša 11

1.6. Područja istraživanja 13

1.6.1. Rimov 14

1.6.2. Cep 15

2. CILJEVI I ISTRAŽIVANJA 16

3. MATERIJALI I METODE....16

3.1. Priprema medija za izolaciju i održavanje bakterijskih sojeva....17

Priprema IBM medija....17

Priprema NSY medija....18

3.2. Eksperimentalni organizmi....19

3.3. Priprema bakterijskih sojeva....20

3.3.1. Bojanje bakterija....22

3.3.2. Inokulacija u svježi NSY medij....23

3.4. Uzorkovanje i priprema eksperimenata....23

3.5. Dizajn eksperimenta....25

3.6. Kvantifikacija i biomasa bakterijskih stanica....30

3.7. Kvantifikacija, biovolumen i parametri mjerenja rasta heterotrofnih bičaša....31

3.8. Kemijski parametri....32

3.9. Obrada podataka....32

4. REZULTATI....33

4.1. Kemijska analiza vode....33

4.2. Rast heterotrofnih bičaša kao odgovor na bakterijski plijen....33

4.2.1. I. Eksperiment (23. travanja do 28. travnja 2012)....34

4.2.1.1. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova....34

4.2.1.2. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti HNF u tretmanima iz Cepa....38

4.2.1.3. Prirast heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa....41

4.2.1.4. Specifični faktor rasta i duljina Lag faze heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa....39

4.2.1.5. Promjene u biomasi bakterija i heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa....45

4.2.2. II. Eksperiment (28. svibnja do 2. lipnja 2012) 48

4.2.2.1. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova ..48

4.2.2.2. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti HNF u tretmanima iz Cepa 52

4.2.2.3. Prirast heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa 55

4.2.2.4. Specifični faktor rasta i duljina Lag faze heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa 563

4.2.2.5. Promjene u biomasi bakterija i heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa 59

4.3. Raspodjela veličina heterotrofnih bičaša 59

4.3.1. Raspodjela veličina heterotrofnih bičaša u vremenu t_0 59

4.3.1.1. Travanj 59

4.3.1.2. Svibanj 59

4.3.2. Raspodjela heterotrofnih bičaša u vremenu t_{66} 64

4.3.2.1. Travanj 64

4.3.2.1. Svibanj 66

4.3.3. Raspodjela heterotrofnih bičaša u vremenu t_{114} 68

4.3.3.1. Travanj 68

4.3.3.2. Svibanj 70

5. RASPRAVA 73

6. ZAKLJUČAK 76

7. LITERATURA 77

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Karelu Šimeku koji mi je omogućio izradu ovoga rada u Republici Češkoj. Zahvaljujem se također mentoru doc.dr.sc. Goranu Palijanu koji mi je pomogao pri pisanju diplomskoga rada te pod čijim je stručnim vodstvom ovaj rad i izrađen. Posebno se želim zahvaliti cijelom timu odjela za Mikrobijalnu ekolgiju voda u Češkim Budejovicama koji su mi pomogli pri prikupljanju uzoraka i obradi podataka. Na kraju, želim se zahvaliti obitelji i prijateljima koji su me podržavali tijekom cijelog moga studija i također mi pomogli pri izradi rada.

1. UVOD

Jedinstvena uloga pelagijalnih bakterijskih zajednica leži u njihovoj sposobnosti transformacije otopljene organske tvari (DOM, dissolved organic matter), u čestićnu tvar, čineći ju dostupnom višim trofičkim razinama. Mali protisti, većinom heterotrofni bičaši (HF), generalno su smatrani glavnom poveznicom između otopljene organske tvari, bakterija i hranidbenog lanca grejzera (Sherr i Sherr, 2002; Jurges i Matz, 2002). Međutim saznanja o tome kojima se konkretno vrstama bakterioplanktona hrane mali protisti, još uvijek su poprilično rudimentarna (Boenigk i Arndt, 2002) i dostupna za samo nekoliko slatkovodnih staništa sa poprilično limitiranom taksonomskom rezolucijom (Pernthaler, 2005; Jezbera i sur., 2005; Salcher i sur., 2008). Zbog toga se nameće važno pitanje na koje treba pronaći odgovor: koje bakterioplanktonske vrste predstavljaju važnu poveznicu u protoku ugljika prema višim trofičkim razinama?

Znanje o brojnosti i vezi između potencijala rasta i grejzingom inducirane stope mortaliteta pojedinih bakterijskih vrsta ključno je za razumjevanje njihove uloge u mikrobijalnim hranidbenim mrežama u različitim slatkovodnim staništima.

Bakterije i fitoplankton formiraju dominantnu frakciju biomase i u morima i u jezerima. Njihova sudbina diktirana je većinom sa dva faktora: predacijom protistima kao što su nanoflagelati i smrću stanica izazvanom virusima. Ove dvije sile imaju vrlo različit utjecaj na sudbinu fitoplanktona i bakterijskog ugljika, ovisno o tome hoće li bakterije biti konzumirane od strane protista i tako postati dio njihovih stanica ili će se jednostavno opet otpustiti u okoliš, putem virusa. Zato protisti igraju kritičnu ulogu u kružnom toku ugljika u vodenim staništima

1.1. Podjela planktona

Plankton je zajedničko ime za organizme koji lebde nošeni strujanjem vode u oceanima, jezerima, rijekama i drugim vodenim tijelima.

Plankton se primarno dijeli u funkcionalne hranidbene skupine:

- Fitoplankton – koristi fotosintezu za pretvorbu sunčeve energije u kemijsku (proizvođači)
- Zooplankton – hrani se fitoplanktonom ili drugim zooplanktonom (potrošači)
- Bakterioplankton – većinom razgrađuje ostatke drugih organizama (razlagači)

Plankton možemo podijeliti i po dimenzijama, odnosno veličini :

- Megaplankton 2-200 cm, veliki zooplankton npr. meduze
- Makroplankton 2-20 cm, velike fitoplanktonske kolonije, veći planktonski račići (npr. Euphasiidae), ostali zooplankton
- Mezoplankton 0,2-2 cm, veći jednostanični organizmi, fitoplanktonske kolonije, mnogi metazoa (npr. Cladocera i Copepoda)
- Mikroplankton 20-200 μm, veći fitoplankton i protozoa, manji metaoza (npr. Rotatoria)
- Nanoplankton 2-20 μm, fitoplankton, protozoa, veće bakterije
- Pikoplankton 0,2-2 μm, većinom bakterije i manji fitoplankton
- Femtoplankton < 0,2 μm, virusi i bakteriofagi (bakteriofagi se od virusa razlikuju oblikom ali ne i principom građe)

1.1.1. Bakterioplankton

U ovom magistarskom radu naglasak će biti na bakterioplanktonu i njegovoj ulozi u slatkovodnim staništima te na odnosu sa heterotrofnim bičašima.
Bakterioplankton se odnosi na bakterijsku komponentu planktona koji pluta u vodenom stupcu. Drugim riječima bakterioplankton predstavlja bakterije koje žive u otvorenim vodama oceana, jezerima te drugim slatkovodnim staništima. One su mikroskopske veličine od 0,2 do 2 μm. U prosijeku u jednom ml vode ima 10^6 bakterijskih stanica. Vrlo su važne u kružnome toku ugljika u oceanima i jezerima. Iako ih je poprilično teško identificirati, važno je znati koje su filogenetske grupe bakterija dominantne u bakterioplanktonu određenog vodenog staništa zato jer dominantne grupe mogu imati različite uloge u kruženju ugljika i drugih biogeokemijskih procesa(Cottrell i Kirchman, 2000) .

1.2. Ciklus ugljika

Ugljik (C) je po zastupljenosti u svemiru četvrti element, a na Zemlji ga ima samo 0,32% (težinski). Međutim, ugljik ima puno veću važnost na Zemlji, jer je sav život kakvog poznajemo zasnovan na ugljiku. U neživoj okolini ugljik se nalazi u obliku CO_2, u atmosferi i otopljen u vodi (uglavnom kao HCO_3^-), u karbonatnim stijenama (npr. vapnenac), u biogenim strukturama (npr. koralji), u fosilnim gorivima (ugljen, nafta, prirodni plin) te u organskoj tvari u tlu. Udio ugljika u živoj tvari (18-20 %) gotovo je 100 puta veći nego u neživoj (oko 0,2 %), što znači da živa bića mogu izdvajati ugljik iz nežive okoline, a kako bi se život mogao održati potrebno je reciklirati ugljik. Zato je poznavanje kruženja ugljika u prirodi od velike važnosti za život na Zemlji.

Ciklus ugljika je biogeokemijski ciklus u kojem se ugljik izmjenjuje između biosfere, litosfere (uključuje fosilna goriva), hidrosfere i atmosfere. Kruženje ugljika događa se zbog različitih kemijskih, fizičkih, geoloških i bioloških procesa. Ukupni globalni ciklus ugljika može se podjeliti na dva manja ciklusa-geološki i biološki. Geološki ciklus ugljika promatra kretanje ugljika između stijena i minerala (litosfera), morske vode (hidrosfera) i atmosfere, a procesi u njemu odvijaju se tijekom milijuna godina. Biološki ciklus odvija se uglavnom između atmosfere i biosfere, i u njemu se procesi odvijaju u puno kraćem vremenu (od jednog dana do više stotina godina). Važno je shvatiti kako ta dva ciklusa nisu sasvim odvojena, jer fotosinteza i respiracija imaju važnu ulogu i u geološkom ciklusu. Dio ugljika kojeg je fitoplankton u moru koristio za izgradnju ljušturica, taloži se na dno oceana stvarajući sedimente. Također, tijekom milijuna godina geološke prošlosti organska tvar se polako pretvarala i u naslage fosilnih goriva. Dakle u biološkim procesima korišteni CO_2 iz atmosfere, se nakon niza godina pohranio u geološke spremnike.

U atmosferi se ugljik nalazi uglavnom u obliku CO_2. Iako u vrlo malom postotku (oko 0,03 % vol.), ima vrlo važnu ulogu za održavanje života na Zemlji jer ga koriste biljke za proces fotosinteze. CO_2 se otapa u morskoj vodi (veća topljivost u hladnoj vodi), a i u vodi koja prolazi kroz tlo, stvarajući ugljičnu kiselinu, koja može otapati vapnenačke stijene. Ugljik se može vratiti u atmosferu disanjem biljaka i životinja, raspadanjem biljnog i životinjskog tkiva, spaljivanjem organskog materijala, oslobađanjem iz tople morske vode i vulkanskim erupcijama. Izgaranjem fosilnih goriva oslobađa se ugljik koji je milijunima godina bio

spremljen u litosferi. Atmosfera je prije industrijske revolucije sadržavala preko 580 Gt ugljika (Gt-gigatona) a u današnjoj atmosferi ta je količina oko 750 Gt i još je u porastu. Biosfera (biljke, životinje, organska tvar u tlu) sadrži oko 2200 Gt ugljika. Posebnu ulogu imaju autotrofni organizmi (biljke, fitoplankton), koji iz anorganskih tvari sami sintetiziraju organske komponente (glukozu i ostale ugljikohidrate) procesom fotosinteze: $6CO_2+6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6+6O_2$. Heterotrofni organizmi hrane se autotrofnima (ili njihovim djelovima-plodovima) te se tako ugljik prenosi biosferom. Biljke i životinje koriste ugljikohidrate nastale fotosintezom (i ostale kompleksne produkte) kao „gorivo" putem procesa respiracije (stanično disanje) $C_6H_{12}O_6+6O_2 \rightarrow 6CO_2+6H_2O$, te se CO_2 vraća u atmosferu ili vodu. Razgradnjom (dekompozicijom) mrtvog organskog materijala gljivicama i bakterijama u aerobnim i anaerobnim uvijetima također nastaju CO_2 i CH_4 kao i izgaranjem biomase (šumski požari). Prijenos iz biosfere u litosferu događa se kad treset (mrtav organski materijal) postaje dio tla, odnosno kad karbonatne ljušturice postaju sastavni dio sedimentnih vapnenačkih stijena. Mora (oceani) sadrže oko 1000 Gt ugljika u površinskom sloju, i oko 40000 Gt ugljika u dubokom oceanu, uglavnom u obliku bikarbonatnih iona. Ugljik lako prelazi između oceana i atmosfere. Količina CO_2 otopljenog u moru uglavnom je određena temperaturom površinske vode (hladnija voda može otopiti više CO_2, hladne struje spuštaju se ispod površine oceana, putuju prema toplijim područjima, dolaze na površinu i otpuštaju CO_2). Neki od morskih organizama mogu vezati bikarbonat iz mora (HCO_3^-) i Ca^{2+} (kalcij) i tako stvoriti kalcijev karbonat za ljušturice ili druge djelove organizma (neke alge, mekušci i koralji). Nakon smrti takvih organizama, njihove karbonatne ljušturice padaju na dno oceana i nakupljaju se kao karbonatom bogat sediment. Nakon geoloških perioda i procesa ti se talozi fizički i kemijski pretvaraju u sedimentne stijene.

Litosfera je najveći spremnik ugljika na Zemlji, a posebno važnu ulogu u proučavanju ljudskog djelovanja na ciklus ugljika (i klimatske promjene koje se povezuju s time) imaju fosilna goriva, koja se danas intenzivno koriste za dobivanje energije.

1.3. Mikrobijalna petlja

Mikrobijalna petlja je sastavni dio cjelokupnog hranidbenog lanca pelagijala. Ona objašnjava trofički put u mikrobijalnoj hranidbenoj mreži gdje se otopljeni organski ugljik (DOC, dissolved organic carbon) prenosi na više trofičke nivoe putem inkorporacije u bakterijsku

biomasu. Taj put nadopunjen je klasičnom hranidbenom mrežom fitoplankton – zooplankton – nekton. Put započinje sa otopljenim organskim ugljikom koji ulazi u vodeni okoliš lizom bakterija, curenjem iz fitoplanktona, hranjenjem zooplanktona, ekskretima životinja itd. Bakterije mikrobijalne petlje razlažu detritus koji se sastoji od otopljene organske tvari (DOM) i čestične organske tvari (POM, particulate organic matter), kako bi iskoristile energetski bogate tvari za rast. Otopljena organska tvar (DOM) je najveći „rezervoar" ugljika, te može biti lako razgradiva putem mikrobijalne petlje. Otopljeni organski ugljik nije direktno dostupan većini vodenih organizama, zato ga bakterije iskorištavaju u hranidbenoj mreži što rezultira kao dodatna energija koja postaje dostupna višim trofičkim nivoima. Mikrobijalna petlja ekološki je značajna zato jer je direktno uključena u ciklus nutrijenata i primarnu proizvodnju što ultimativno utječe na velik broj ekoloških funkcija.

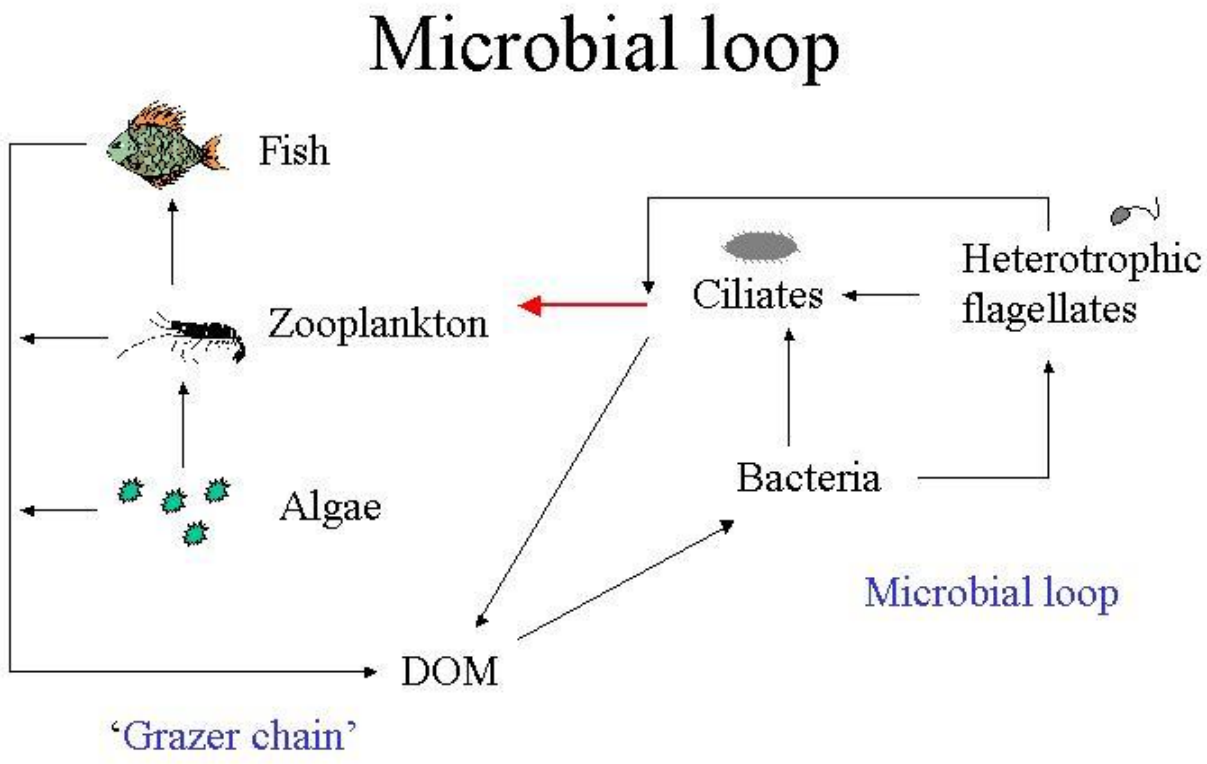
1.3.1. Otopljena organska tvar – DOM

DOM predstavlja organske molekule u vodenim sustavima koje su različita podrijetla i sastava. „Otopljeni" dio organskog ugljika odnosi se na komponente manje od 0,2 μm, što ujedno predstavlja i granicu između otopljene i čestične organske tvari. DOC, odnosno DOM može nastati: curenjem iz fitoplanktona, lizom virusima, ostatcima hranjenja („sloppy" feeding) te od izmeta i uginulih organizama. DOM je u morskim i slatkovodnim staništima jedan od najvećih cikličkih, povratnih rezervoara organske tvari na Zemlji. DOM je također izuzetno važan kod transporta metala u vodenim sustavima. Metali čine iznimno jake komplekse sa DOC što povećava njihovu topljivost te također smanjuje njihovu bioraspoloživost. DOM podupire rast mikroorganizama i igra važnu ulogu u globalnom ciklusu ugljika putem mikrobijalne petlje.

1.3.2. Biološke interakcije unutar mikrobijalne petlje

Frakcija unutar DOM koja je biorazgradiva sastoji se od organskih molekula koje heterotrofne bakterije koriste kao izvor energije i ugljika. Možemo reći da DOM predstavlja hranu za bakterije. Bakterije su jedini organizmi sposobni reciklirati DOM što ih zapravo čini ekstremno važnom komponentom za održavanje kontinuiteta i funkcioniranja ekosustava. Nadalje, bakterijama se hrane heterotrofni bičaši i trepetljikaši. Heterotrofnim bičašima se

hrane trepetljikaši i time završava mikrobijalna petlja te se nastavlja klasičan hranidbeni lanac. Organska tvar, ugljik, prenosi se na više trofičke razine. Sljedeći na redu je zooplankton koji se hrani fitoplanktonom, trepetljikašima i heterotrofnim bičašima, zooplanktonom se hrane ribe itd. do sve viših trofičkih razina. Na kraju se DOM ponovno reciklira kako se organizmi sa svih trofičkih razina hrane i ugibaju (Slika 1.).



Slika 1. Shematski prikaz mikrobijalne petlje unutar hranidbenog lanca.
„Microbial loop" – DOM – otopljenu organsku tvar koriste bakterije za dobivanje energije i ugljika, bakterijama se hrane heterotrofni bičaši i trepetljikaši
„Grazer chain" – Fitoplankton (alge) su primarni proizvođači , njima se hrani zooplankton. Zooplankton se također hrani bičašima i trepetljikašima a zooplanktonom se hrane ribe. (web1)

1.3.3. Faktori koji kontroliraju mikrobijanu petlju

Učinkovitost mikrobijalne petlje određuje se gustoćom bakterija unutar nje (Taylor i Joint, 1990). Logično je da je gustoća bakterija uglavnom pod kontrolom grejzinga manjih protozoa i različitih taksonomskih grupa bičaša. Također, infekcije virusima uzrokuju lizu bakterijskih stanica, čime se sadržaj stanice ponovno otpušta u otopljenu organsku tvar – DOM, smanujući učinkovitost mikrobijalne petlje. Smrtnost od infekcije virusima ima gotovo isti utjecaj kao i grazing protozoa zato možemo reći da oboje imaju veliki utjecaj na rast bakterija. Osim toga, mikorbijalna petlja dominira u oligotrofnim vodama prije nego u eutrofnima, gdje prevladava klasična planktonska hranidbena mreža, zbog čestih opskrba mineralnim hranjivim tvarima.

1.3.4. Ekološki značaj i važnost mikrobijalne petlje

Mikrobijalna petlja je od osobite važnosti u povećanju učinkovitosti hranidbene mreže putem iskorištavanja otopljene organske tvari – DOM, koja je obično nedostupna većini organizama koji žive u vodi. U tome smislu, ovaj proces pomaže recikliranju organske tvari i nutrijenata i posreduje prijenosu energije iznad termokline. Više od 30 % otopljenog organskog ugljika (DOC) inkorporiranog u bakterije otpušta se u obliku CO_2. Drugi glavni učinak mikrobijalne petlje u vodenom stupcu je taj da ubrzava mineralizaciju kroz regeneraciju produkcije u okolišu koji je organičen nutrijentima. Bakterije su baza hranidbene mreže u većini vodenih staništa i poboljšavaju trofičku učinkovitost hranidbenih mreža. Stoga mikrobijalna petlja, zajedno sa primarnom produkcijom kontrolira produktivitet vodenih sustava.
Od nedavno se smatra kako bi mikrobijalna petlja trebala biti proširena. Kemijske komponente u tipičnim bakterijskim stanicama (kao što su DNA, lipidi, šećeri itd.) i slične vrijednosti omjera C:N po čestici pronađeni su u mikročesticama koje su formirane abiotički. To također može biti klasificirano kao mikročestica koja je potencijalno atraktivna hrana bakteriovornom planktonu. Ako je to točno, trebalo bi se razmišljati o proširenju mikrobijalne petlje sa uvođenjem direktnog prijenosa otopljene organske tvari putem abiotskih mikročestica, na više trofičke razine. To predstavlja veliku ekološku važnost zbog dvije stvari. Prvo, događa se bez gubitka ugljika i čini organsku tvar više dostpunom fagotrofnim organizmima a ne samo heterotrofnim bakterijama. Nadalje abiotička transformacija u

proširenoj mikrobijalnoj mreži ovisi samo o temperaturi i kapacitetu DOM da se agregira, dok biotička transformacija ovisi o biološkoj dostupnosti (Kerner i sur. 2003).

1.4. Opće karakteristike roda *Limnohabitans*

Rod *Limnohabitans* (porodica Comamonadaceae, koljeno Proteobacteria) utemeljio je Hahn i sur. (2010.) i dosada sadrži četiri opisane vrste (Kasalicky i sur., 2010).. Rod predstavlja filogenetički klaster formiran većinom sekvencama dobivenim iz okoliša, putem kultivacijom-neovisnih metoda, iz brojnih slatkovodnih sustava (npr.. Zwart i sur., 2002; Crump i Hobbie, 2005; Percent i sur., 2008, Shaw i sur., 2008) koji je prije obuhvaćao „Rhodoferax sp. BAL47 klaster“ (Zwart i sur., 2002).
Ime *Limnohabitans* (grč. limno - jezero; habitans – naseljavati) odnosi se na tip staništa iz kojega je ova vrsta prvi puta izolirana (Hahn i sur., 2010).
Aerobne, fakultativno anaerobne, kemoautotrofne, oksidaza- i katalaza- pozitivne bakterije. Stanice im nisu pigmentirane i nepokretne su, te su ravna ili zakrivljena štapićasta oblika. Nisu halotolerantne, ne rastu na NaCl koncentracijama > 0,5 % i mezofili su. Poznati sojevi izolirani su iz vodenog stupca slatkovodnih staništa. Rod je povezan sa razredom Betaproteobacteria i porodicom Comamonadaceae (Kasalicky i sur., 2010). Rodu pripadaju slijedeće opisane vrste: *Limnohabitans curvus, L. parvus, L. planktonicus, L. australis.*
Bakterije roda *Limnohabitanas* pokazuju visoku stopu rasta i metaboličku fleksibilnost u inkorporaciji jednostavnih organskih supstrata, vjerovatno prilagođavajući se životnom stilu „gozba ili gladovanje“ („feast or famine“) (Pernthaler, 2005; Šimek i sur., 2011) i osobito su usko povezane s organskim supstancama izvedenim od algi (algal-derived organic substances) i sa stopom ekstracelularne produkcije fitoplanktona (Perez i Sommaruga, 2006; Šimek i sur., 2001; 2008). Njihov visoki potencijal rasta je u protuteži sa znatnom ranjivošću na grejzing protista (Jezbera i sur., 2005; Hornak i sur., 2006). Ove bakterije imaju tendenciju povećati svoje proporcije duž gradijenta rastućeg pH, od područja bogatih kiselim i humoznim supstancama prema cirkum-neutralnim ili alkalnim jezerima gdje one čine 5-30 % ukupnog bakterioplanktona (prosiječno ~12 %) (Šimek i sur., 2010). Bakterije roda *Limnohabitans* također iznad proporcionalno doprinose ukupnoj bakterioplanktonskoj biomasi jer posjeduju generalno veći prosječni volumen stanice (između 0,05-0,16 μm^3) nego tipične bakterioplanktonske stanice (Šimek i sur., 2006). Veličina bakterijskih stanica u pozitivnoj je

korelaciji s veličinom genoma, metaboličkom prilagodljivošću (misli se na iskorištavanje supstrata) i potencijalom rasta bakterija. Manje stanice posjeduju manji genom i mnogo su manje osjetljive na predaciju od strane heterotrofnih bičaša (Šimek i sur. 2001, Jezbera sur. 2005), ali pokazuju relativno pasivan stil života (npr. niska metabolička prilagodljivost, vrlo malen broj gena za prijenos signala itd. Hahn i sur. 2012). Sveukupno, ove ekološke karakteristike sugeriraju ključnu ulogu bakterija roda *Limnohabitans* u protoku ugljika na više trofičke razine i čine ih prikladnim modelnim organizmima za specifične eksperimente.

1.4.1. *Limnohabitans curvus* (Hahn et al. 2010)

Limnohabitans curvus (pridjev *curvus* – lat. zakrivljen, vijugav) ima sve navedene karakteristike pripadajućeg roda. Stanice su dužine 1,0 – 1,5 μm a široke 0,4 – 0,5 μm. Kolonije rastu na NSY agaru, bez pigmenata su, kružne i konveksne sa glatkom površinom. Rast se pojavljuje u rasponu temperature od 4 – 34 °C. Tip soja MWH–C5^T izoliran je je iz jezera Mondsee, Austrija (Hahn i sur., 2010).

1.4.2. *Limnohabitans parvus* (Kasalický et al. 2011)

Limnohabitans parvus (pridjev *parvus* – lat. malen) ima stanice vrlo malih dimenzija. Stanice su gram – negativne, kratke, štapićaste, promjera 0,3 μm a dužine 0,6 μm. Rast je zabilježen na 4-34 °C, pokazuje slab anaerobni rast. Tip soja II-B4^T, izoliran je iz slatkovodnog mezoeutrofnog rezervoara vode Rimov u Republici Češkoj, pokazuje slobodnoživući planktonski stil.

1.4.3. *Limnohabitans planktonicus* (Kasalický et al.. 2011)

Limnohabitans planktonicus (pridjev *planktonicus* – grč. lutati) živi u planktonu. Stanice su gram–negativni štapići, promjera 0,3 – 0,4 μm i duge 0,9 μm. Rast je zabilježen na 4-34 °C, primjećen je slab rast u anaerobnim uvjetima. Tip soja II-D5^T, također je izoliran iz rezervoara Rimov.

1.4.4. *Limnohabitans australis* (Hahn et al. 2010)

Limnohabitans australis (pridjev *australis* – lat. južno) ime je izvedeno prema regiji iz koje je organizam izoliran. Stanice su zakrivljeni štapići, dužine 1,0 – 1,7 µm a široke 0,4 – 0,5 µm. Kemoautotrofi, aerobi, fakultativni anaerobi. Kolonije rastu na NSY agaru i nepigmentirane su, kružne i konveksne sa glatkom površinom. Rast je zabilježen na 12-36 °C. Tip soja MWH-BRAZ-DAM2D^T izoliran je iz ribnjaka Monjolinho u Brazilu.

1.5. Opće karakteristike heterotrofnih bičaša

Riječ bičaši odnosi se na stupanj organizacije. Možemo reći kako su to protisti koji će većinu svoga života provesti hraneći se i krečući se pomoću bičeva. Ovaj stupanj organizacije najrašireniji je među protistima. Od 60 rodova protista koji su do danas identificirani među eukariotima, 27 njih smatra se bičašima. Heterotrofni bičaši (HF) poznati su kao najvažniji grejzeri bakterija u mnogim vodenim ekosustavima, te su prepoznati kao konzumenti, kako suspendiranih tako i pričvršćenih bakterija (Boeing i Hartmunt, 2002). Značajna fleksibilnost utjecaja grejzinga od strane zajednica bakteriovornih bičaša stvara kompleksan „top-down“ pritisak na bakterije što je najvjerovatnije vodilo evoluciji mehanizama uspješnog izbjegavanja predatora kod bakterija i to bi djelomično trebalo biti odgovor na raznolikost današnjih bakterija (Jurgens i Matz, 2002). Evolucijska veza između različitih skupina bičaša još je uvijek diskutabilna (npr. Patterson, 1999). Zbog malobrojnih karakterističnih značajki, identifikacija epifluorescentnom mikroskopijom u fiksiranom materijalu je dosta teška. Ekolozi su suočeni s problemom jer ne postoji niti jedan opsežan ključ za determinaciju vrsta. Međutim, postoji nekoliko radova koji mogu biti od velike pomoći pri identifikaciji (Boenigk i Harmut 2002). Štura ideja o današnjem razumjevanju relativne važnosti uobičajnih vrsta u pelagijalnim i bentoskim staništima sažeta je Tablicom 1.

1.5.1. Podjela heterotrofnih bičaša

Heterotrofni bičaši mogu se podjeliti prema veličini:

- Heterotrofni mikrobičaši (HMF) su oni jednaki ili veći od 15 μm. (Znatno su manje brojnosti i zahtjevaju drugačije metode kvantifikacije)
- Heterotrofni nanobičaši (HNF) su od 2 do 20 μm i smatrani su najbrojnijom baktriovornom skupinom.
- Heterotrofni pikobičaši (HPF) su oni manji od 2 μm (najbrojnija skupina u oceanima)

Zajednice heterotrofnih bičaša mogu se podjeliti još u dvije skupine a to su zajednice pelagijala i zajednice bentosa. Ovu podjelu utemeljili su Boenigk i Harmut 2002.

Tablica 1. Glavne taksonomske grupe heterotrofnih bičaša prisutne u pelagijalu i bentosu prema dosadašnjim saznanjima. ◦ i • pokazuju relativnu važnost što se tiče brojnosti i biomase odnosno različitih tipova staništa. Bijeli kružić predstavlja brojnost a, crni biomasu (jedan kružić 10 %) (Boenigk i Harmut 2002).

Uobičajne taksonomske skupine	**Uobičajne vrste**	**Pojavljivanje u pelagijalu**		**Pojavljivanje u bentosu**	
		slatkovodni	**morski**	**slatkovodni**	**morski**
Euglenozoans					
Euglenids	*Petalomonas, Peranema*	◦	◦	•••••••◦◦	••••••◦◦
Kinetoplastids	*Bodo, Caecitellus*	◦	◦	•••••◦◦◦◦	••••◦◦◦◦
Cryptomonads	*Goniomonas*	◦	◦	•◦	•◦
Stramenopiles					
Chrysomonads	*Spumella, Paraphysomonas*	•••••••◦◦◦◦◦◦	•••◦◦◦	◦	◦
Bicosoecids	*Cafeteria, Bicosoeca*	••◦◦◦	••◦◦◦	•◦	•◦
Alveloates					
Dinoflagellates	*Gymnodinium, Katodinium*	•••◦	••••••◦	◦	•••◦
Choanoflagellates	*Monosiga, Diaphanoeca*	•••◦◦◦	•••◦◦◦	◦	◦
Protista incertae sedis					
Cercomonads	*Cercomonas, Bodomorpha*	◦	◦	•◦◦◦	•◦◦◦
Kathablephardis	*Kathablepharis, Leucocryptos*	••◦◦	••◦◦	◦	◦
Thaumatomonads	*Protaspis, Thaumatomonas*	◦	◦	••◦◦	••◦◦
Apusomonads	*Amastigomonas, Apusomonas*	◦	◦	•◦	•◦
Ebriids	*Ebria*		•••◦		
Ancyromonads	*Ancyromonas*	◦	◦	•◦	•◦
Različite skupine neodređenog sistematskog srodstva	*Metromonas, Diphylleia, Metopion, Telonema*	•••◦◦	••◦◦	••◦◦	••◦◦

1.6. Područja istraživanja

Istraživanje je obavljeno u Republici Češkoj u pokrajini Južna Češka (Slika 2). Temeljeno na prethodnim studijama izabrana su dva lokaliteta, različite veličine, pH i sadržaja humoznih supstanci. Prvo je Rimov, mezo-eutrofni rezervoar pitke vode, cirkum neutralnog pH koji predstavlja ne-humozni lokalitet (Šimek i sur., 2006; 2008). Drugo je jezero Cep, blago kiselog pH 6-6,5 i mnogo manje površine.



Slika 2. Karta pokrajine Južna Češka (web2)

1.6.1. Rimov

Rimov rezervoar (Slika 3) nalazi se na rijeci Malše, južno od glavnoga grada Južne Češke, Čeških Budejovica. Rezervoar je završen 1978. i služi za opskrbu pitkom vodom, kao elektrana i kao zaštita od poplava. Brana visoka 48,5 m drži 34 milijuna kubičnih metara vode, raširenih na 210 ha u obliku slova V (kanjonski oblik), u uglavnom pošumljenoj dolini. Teoretski zadržavanje vode u rezervoaru je 92 dana. Prosječna dubina je 16 m. Budući da je izvor pitke vode zaštićen je i nije dozvoljena uporaba u druge svrhe.
Rezervoar je kanjonskog oblika i u svojim uzdužnim djelovima je eutrofan dok je u onima bliže brani mezotrofan, u smislu topivog i reaktivnog fosfora. Razlikuje se od tipičnih jezerskih sustava koja su relativno homogena jer ima kratko retencijsko vrijeme i pokazuje izraženu heterogenost u dostupnosti nutrijenata i planktonske sukcesije, od djela gdje se ulijeva rijeka do jezerskog dijela (Šimek i sur., 2006).



Slika 3. Fotografija rezervoara Rimov
Na fotografiji strelicom je naznačeno mjesto uzorkovanja (web3)

1.6.2. Cep

Cep je jedno od 11 jezera (Slika 4) koja pripadaju tzv. Trebonskom bazenu koji je uključen u rezervoare biosfere u okviru mreže UNESCO-a 1997. Regija je poznata po bogatoj raznolikosti močvarnih ekosustava. Cep je smješten u poplavnoj dolini rijeke Lužnice i predstavlja pješčanu jamu koja se puni vodom iz rijeke. Cep je umjetno jezero, nastalo je iskopavanjem i potapanjem rudnika u prošlosti. Kako je dno jezera pješčano siromašno je nutrijentima. Danas je površina jezera otprilike 29 ha a dubina je od 6 do 8 m. Jezero je većinom okruženo borovom šumom i u manjem razmjeru hrastovom.



Slika 4. Fotografija jezera Cep
Na fotografiji možemo uočiti pješčane obale jezera te borovu šumu koja ga okružuje. Strelicom je označeno mjesto uzorkovanja. (web4)

2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovoga rada su slijedeći:

- Odrediti brojnost heterotrofnih bičaša kao odgovor na bakterijski plijen
- detektirati parametre rasta (μ-specifična stopa rasta, procijena prinosa rasta, dužinu lag faze, raspon vremena eksponencionalnog rasta)
- izračunati volumen i biomasu bakterija i HNF
- odrediti raspodjelu veličina HNF u ovisnosti o vremenu i ponuđenim sojevima bakterija
- odgovoriti na pitanje o kvaliteti hrane izabranih sojeva bakterija roda *Limnohabitans* za prirodne zajednice HNF

3. MATERIJALI I METODE

Testiran je učinak hranidbene kvalitete tri bakterijska soja različite veličine i morfologije iz istoga roda, *Limnohabitans* (Tablica 2.) na rast prirodnih zajednica heterotrofnih bičaša iz dva različita vodena tijela, slatkovodnog rezervoara Rimov i jezera Cep u dvije različite faze planktonske sukcesije. Prvi eksperiment proveden je u tjednu od 23. travnja do 28. travnja 2012. godine i predstavlja početak proljetnog razvoja heterotrofnih organizama, kao i početak proljetnog maksimuma heterotrofnih bičaša u rezervoaru Rimov (~4,5 x 10^3 HNF ml^{-1}). Drugi eksperiment proveden je u tjednu od 28. svibnja do 2. lipnja 2012. godine te predstavlja fazu u kojoj je podjednak rast svih članova zajednice i početak faze recikliranja nutrijenata.
Tjedan dana prije svakog eksperimenta obavljena je provjera i priprema bakterijskih sojeva, kako bi se utvrdilo jesu li zagađeni i jesu li spremni za eksperiment. Također tjedan dana prije eksperimenta uzimani su uzorci vode iz Rimov-a i Cep-a kako bi se provjerio točan broj bakterija i HNF koji su prirodno prisutni u vodi.

3.1. Priprema medija za izolaciju i održavanje bakterijskih sojeva

Medij koji je upotrebljavan za održavanje bakterijskih sojeva naziva se NSY (Nutrient broth soyotone yeast extract) medij. Kako bi se pripremio NSY medij prvo se treba pripremiti IBM (inorganic basal medium) medij ili anorganski bazalni medij.
Priprema IBM medija

- Izvorna otopina 1 predstavlja zapravo skup vodenih otopina različitih kemikalija:

  1a: $MgSO_4$ x 7 H_2O …… 7,5 g /100 ml

  1b: $Ca(NO_3)_2$ x 4 H_2O …… 4,3 g /100 ml

  1c: $NaHCO_3$ ……..... 1,6 g /100 ml

  1d: KCl ……..... 0,5 g /100 ml

  1e: K_2HPO_4 . 3 H_2O ……..... 0,37 g /100 ml

- Izvorna otopina 2:

  $FeCl_3$ x 6 H_2O …….. 0,1 g

  Redestilirana voda ……... 100 ml

  HCl koncentrirana ……... 1 ml

- Otopina mikroelemenata:

  $CO(NO_3)_2$ x $6H_2O$ …… 2 g

  $CuSO_4$ x 5 H_2O ……. 0,3 g

  $MnCl_2$ x 4 H_2O …….. 5 g

  Na_2MoO_4 x 2 H_2O …… 0,2 g

  $ZnSO_4$ x 7 H_2O ……. 1 g

  H_3BO_3 ……... 5 g

  Redestilirana voda …… 1 litra

- Izvorna otopina 3:

  Otopina mikroelemenata ……... 1 ml

  Redestilirana voda ……. 100 ml

- IBM medij:

  U 1000 ml redestilirane vode odpipetiramo 1 ml otopina broj 1a, 1b, 1c, 1d i 1e. Nakon toga 3 ml otopine 2 i 1 ml otopine 3.

Priprema NSY medija

Kako bi dobili NSY medij uzmemo prethodono pripremljeni IBM medij i u njega dodajemo slijedeće dehidrirane medije (proizvođač BD Difco^{TM}):

Nutrient Broth …….. 1 g

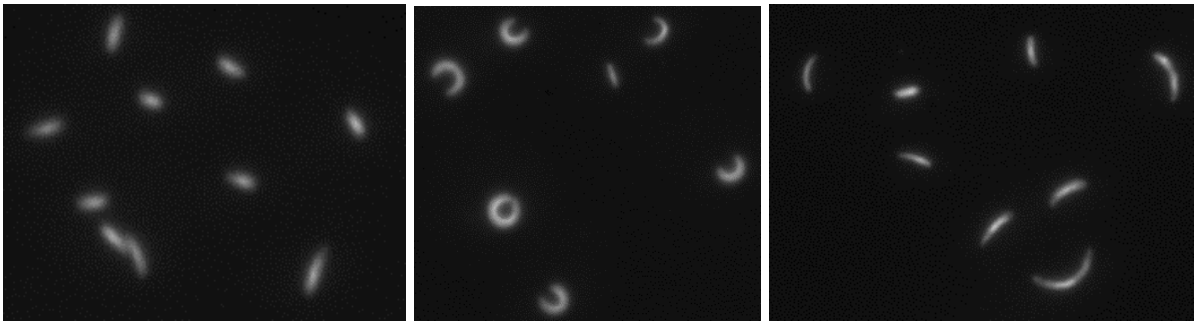
Soytone Peptone …….. 1 g

Yeast Extract …… 1 g

Oba medija pripremana su u staklenim laboratorijskim čašama od 1000 ml. Pripremljeni NSY medij u staklenoj čaši stavljamo na magnetsku mješalicu (CAT Ingenieurbüro M Zipperer GmbH) i mješamo na srednjoj brzini. Pomoću stolnog pH metra (SANXIN MP511 Lab pH Meter) mjerimo pH i namještamo ga između 7,2 i 7,3 dodavanjem kiseline (HCl) ili lužine (NaOH). Kada je pH namješten presipavamo medij pomoću menzure u Erlenmayerove tikvice od 50 ml. Tikvice autoklaviramo na 121 °C 20 min. Nakon sterilizacije tikvice sa NSY medijem se čuvaju u laboratorijskom inkubatoru na 18 °C.
NSY medij služio je za održavanje bakterijskih sojeva koji su korišteni u ovom istraživanju.

3.2. Eksperimentalni organizmi

U ovom istraživanju korištena su tri različita bakterijska soja, izolirana iz dva različita slatkovodna staništa. Sojevi su predstavljali plijen za heterotrofne bičaše (Slika 5).
Odabrana tri soja pripadaju rodu *Limnohabitans* (iz R-BT065 subklastera Betaproteobakterija, Šimek i sur., 2001; Kasalicky i sur., 2010) i različitih su veličina i oblika. Soj nazvan D5 – *Limnohabitans planktonicus* predstavlja već poznat i opisan soj za koji je dokazano da je dobro jestiv i podržava rast HNF (Šimek i sur., neobjavljeni rezultati), štapićasta je oblika i izoliran iz rezervoara Rimov. Zatim KL soj koji još nije opisan a pripada rodu *Limnohabitans*, oblika je velikog solenoida i također je izoliran iz Rimova i soj T6, oblika tankog uvrnutog štapića i izoliran iz male bare u poplavnom području rijeke Lužnice (Tablica 2).



A) **B)** **C)**

Slika 5. Mikroskopske fotografije tri različita soja korištena kao plijen za prirodne zajednice HNF.
A) Soj D5 – *Limnohabitans planktonicus,* B) Soj KL – *Limnohabitans* sp., C) Soj T6 – *Limnohabitans* sp.

Tablica 2. Karakteristike bakterijskih sojeva upotrebljenih kao plijen za zajednice HNF

Vrsta	**Soj**	**Pripadanje**	**Volumen stanice (μm^3)**	**Duljina stanice (µm)**	**Oblik**	**Podrijetlo**	**Reference**
Limnohabitans planktonicus	D5	R-BT065 cluster, Betaproteobacteria	0,135 (± 0,079)	1,075 (± 0,276)	Veliki štapići	Rimov rezervoar	Kasalický et al. 2010
Limnohabitans sp.	KL	R-BT065 cluster, Betaproteobacteria	0,204 (± 0,110)	1.164 (± 0,294)	Veliki solenoid	Rimov rezervoar	Kasalický et al. submitted
Limnohabitans sp.	T6	R-BT065 cluster, Betaproteobacteria	0,128 (± 0,110)	1,139 (± 0,198)	Tanki uvrnuti štapić	Mala bara u poplavnom području Lužnice	Kasalický et al. submitted

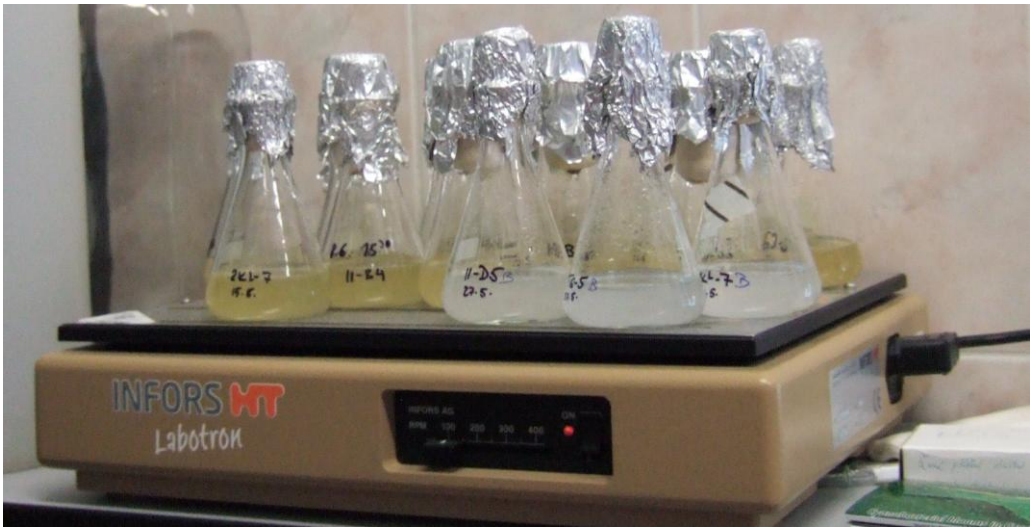
3.3. Priprema bakterijskih sojeva

Izolati sojeva čuvaju se na laboratorijskoj tresilici, na hranjivom tekućem NSY mediju, u Erlenmayerovim tikvicama od 50 ml, na sobnoj temperaturi. Erlenmayerove tikvice začepljene su čepom od staničevine i čep je prekriven aluminijskom folijom (Slika 6). Kako bi provjerili stanje sojeva trebalo je uzeti uzorak iz Erlenmayerove tikvice. Uzimanje uzorka

radilo se u sterilnim uvijetima, u laminaru. Za uzimanje uzoraka bio je potreban slijedeći pribor i kemikalije:

- bakterijski sojevi D5, KL i T6
- stalak za Eppendorf epruvete,
- 3 Eppendorf epruvete od 1 ml,
- mikropipeta od 1 ml i od 50 µl
- nastavci za mikropipete
- prethodno pripremljen IBM medij
- crni marker za označavanje
- rukavice
- formaldehid
- stolni vortex
- plamenik

U laminaru se radi u sterilnim uvijetima i uz upaljeni plamenik. Prije rada u laminaru, stvaljaju se rukavice i površina laminara i sav pribor koji se stavlja unutra prebriše se alkoholom (70 %-tnim etanolom). Nakon toga označe se Eppendorf epruvete sa odgovarajućim oznakama pripadajućih sojeva. Iz svake Erlenmeyerove tikvice odpipetira se mikopipetom po 50 µl uzorka u Eppendorf epruvete. Svaki puta kad se otvara i zatvara tikvica prođe se lagano grlom kroz plamen kako bi se spriječila kontaminacija sojeva. Nakon uzimanja 50 µl od svakog soja, u svaku se Eppendorfovu epruvetu odpipetira još po 900 µl IBM medija, kako bi se razrijedili koncentrirani uzorci, te 50 µl formaldehida (konačna koncentracija 2 % ([vol/vol]) kako bi fiksirali uzorke. Uzorci se protresu na laboratorijskom vorteksu i ostave 20 minuta.



Slika 6. Bakterijski sojevi na tresilici

3.3.1. Bojanje bakterija

Nakon fiksacije uzorci su bojani kako bi se pripremili za epifluorescentnu mikroskopiju i kako bi se kvantificirali. Za bojanje su se koristili membranski, crni, polikarbonatni filteri (Poretics ili Nucleopore) čija je veličina pora 0,2 µm. Membranski filteri postavljaju se na nosače koji se nalaze na aparaturi za filtraciju, a aparatura je povezana sa vakuum pumpom. Nakon što se postave membranski filteri stavlja se lijevak i pričvršćuje metalnom štipaljkom (Slika 7). Uzorak protresemo na vorteksu i mikropipetom dodamo 500 µl uzorka u lijevak. Postupak se ponovi i za preostala dva soja. Zatim se pomoću boce štrcaljke dodalo malo destilirane vode u svaki lijevak i 50 µl boje 4-6-diamidin-2-fenilindol (DAPI, konačna koncentracija 0,2 % [wt/vol]) prema Porter i Feig (1980), tako da je na kraju u lijevku bilo oko 900 µl uzorka. DAPI je visoko specifična za DNA stanice i gradi kompleks koji fluorescira plavo. Sve zajedno se malo promućka i ostavi 5 minuta kako bi se vezala boja. U međuvremenu pripreme se i označe predmetnice za mikroskop. Nakon 5 minuta uključi se vakumska pumpa i čeka se dok se ne profiltrira cijeli volumen uzorka. Pomoću pincete prenesu se membranski filteri na predmetna stakalca i kapne se jedna kap imerzijskog ulja, preko toga se stavlja pokrovnica i još jedna kap imerzijskog ulja. Kvantificiranje se obavljalo pomoću epifluorescentnog mikroskopa (Olympus BX 60) na povećanju x1000. Bakterije se broje u otprilike 20-50 vidnih polja okularne mreže ili dok se ne nabroji otprilike 400

bakterijskih stanica. Broj bakterijskih stanica u mililitru vode izračunava se prema slijedećoj formuli:

Broj bakterija/broj polja x F (faktor mikroskopa) / volumen uzorka (ml) = broj bakterijskih stanica/ml



Slika 7. Aparatura za filtraciju

3.3.2. Inokulacija u svježi NSY medij

Nakon što su sva tri bakterijska soja provjerena i nakon što je utvrđeno da nema nikakvih zagađenja, izvršena je inokulacija u svježi NSY medij. Inokulacija se obavlja tako da 500 µl uzorka prenesemo iz postojećeg soja u svježe pripravljen medij. Postupak radimo u laminaru. Na taj način bakterije su dobile novi prostor za rast i razvijanje.

3.4. Uzorkovanje i priprema eksperimenata

Tri dana prije početka svakog eksperimenta (20.4. i 25.5. 2012.) obavljeno je uzorkovanje vode sa svakog lokaliteta. Uzorci su uzimani u bačve zapremine 10 litara. Prvo se uzorkovalo na Rimov rezervoaru, voda je uzimana u bačvu, 2-2,5 m od obale, sa privezanog čamca i sa

površinskog sloja. Na drugom lokalitetu, jezeru Cep, voda je bila uzorkovana 1-1,5 metara od obale, također sa površinskog sloja. Na oba lokaliteta voda se uzorkovala na način da je otvor bačve bio do pola uronjen u vodu. Dakle prikupljene su dvije bačve, po jedna na svakome lokalitetu.

Nakon dolaska u laboratorij iz svake bačve uzimano je tri puta po 50 ml uzorka i fiksirano sa 2,5 ml formaldehida, znači, iz svake bačve uzimano je po tri poduzorka. Nakon 2 sata fiksacije uzorci su bojani za epifluorescentnu mikroskopiju. Kod uzoraka iz prirode, gdje je manji broj bakterijskih stanica i bičaša nego kada se uzgajaju u laboratorijskim uvijetima, upotrebljavamo i veći volumen uzorka koji ćemo filtrirati i obojati. Za bakterije je to otprilike 2 – 5 ml a za HNF od 5 – 10 ml. Bakterije i HNF bojaju se po istom postupku koji je prethodno opisan. Razlika je u tome što kod HNF treba manje vremena da se DAPI veže za njihovu DNA, tako da su oni bojani oko 3 minute i kod kvantificiranja epifluorescentnim mikroskopom broji se otprilike 200 organizama. Ova provjera radi se kako bi utvrdili broj bakterija i HNF na oba lokaliteta. Ovo je bitno jer se može dogoditi da u uzorcima iz prirode nema dovoljno heterotrofnih bičaša za pokretanje eksperimenta pa se oni moraju prethodno inkubirati kako bi se potaknuli na rast, što se dogodilo u provođenim eksperimentima.

Od ostatka vode u bačvama, po 1,5 L uzimana je za kemijsku analizu vode. Većina bakteriovornih HNF su stanice manje od 5 μm te su stoga četiri litre vode sa svakog lokaliteta gravitacijski filtrirane kroz filter pore 5 μm i promjera 147 cm, razdjeljene u 2 staklene boce zapremine 2 litre i ostavljene u inkubatoru na 18°C u mraku do početka eksperimenta (36 h). HNF u filtriranoj vodi na ovaj način bivaju oslobođeni od grejzinga metazooplanktona. Nakon 36 h broj HNF u uzorcima povećava se za otprilike dva puta a broj slobodnoživućih bakterija opada. Četiri litre vode sa oba lokaliteta također su gravitacijski filtrirane kroz filter pore 0,2 μm i time je uklonjena većina bakterija i većih čestica. Također su četiri litre vode profiltrirane u 2 boce zapremine 2 litre i stavljene u autoklav na sterilizaciju. Ova voda poslužit će na početku eksperimenta za razrijeđenje 1:1 u slučaju da broj HNF bude prevelik. Brojnost HNF u uzorcima može se namjestiti na otprilike 500 jedinki u mililitru razrijeđivanjem sa vodom koja je filtrirana kroz filter pore 2 μm kako bi smanjili gustoću bakterija iz prirode i kako bi standardizirali eksperimentalni protokol. Ovo se radi ako se testira paralelno više sojeva bakterija koje predstavljaju plijen za iste prirodne zajednice HNF ili ako imamo uzorke HNF sa različitih lokaliteta.

3.5. Dizajn eksperimenta

23. travanja (I. eksperiment) i 25. svibanja (II. eksperimet) bili su prvi dani eksperimenata. U 7:30 ujutro, izvađene su staklene boce s vodom iz Rimov-a i Cep-a koje su ostavljene na inkubaciji 36 h. Nakon toga uzimano je 3 puta po 50 ml poduzorka vode od svakoga lokaliteta. Uzorci su obojani za epifluorescentnu mikroskopiju i izbrojane bakterije i HNF. Za konačan broj HNF i bakterija, uzimana je srednja vrijednost triplikata. Ustanovljeno je kako je broj HNF viši od 500 ml^{-1} na oba lokaliteta i da se uzorci trebaju razrijediti sa 0,2 μm filtriranom i steriliziranom vodom. Razrijeđenje je kod oba eksperimenta napravljeno u omjeru 1:1, 3 litre 5 μm filtrirane vode iz Rimova pomješano je sa 3 litre 0,2 μm filtrirane i sterilizirane vode iz Rimova. Isti postupak ponovljen je s vodom iz Cepa. Voda je mješana u kanisterima, zapremine 6 litara s pumpicom za otpuštanje vode, koji su prethodno sterilizirani (Slika 8). Prvo je iz svakog kanistera u triplikatima za svaku lokaciju uzimano po 50 ml otopine HNF i fiksirano sa 2,5 ml formaldehida te obojano za epifluorescentnu mikroskopiju. Ove uzorke označili smo kao početnu točku (prije dodavanja bakterija koje će služiti kao plijen) i kvantificirali smo bakterije kako bi odredili koliko ćemo točno dodati bakterijskih sojeva u uzorke HNF.

Dizajn eksperimenta prikazan je na Slikama 10 i 11. Kako bakterije iz sojeva, koji će se testirati kao plijen, imaju različit volumen stanica (pogledati Tablicu 2.), početni broj stanica svakog bakterijskog soja dodanog u eksperimentalne tretmane, namješten je da odgovara približno istoj početnoj biomasi za sva tri soja. To zapravo znači da je biomasa bakterija, koje će služiti kao plijen za zajednice HNF, podešena tako da predstavlja približno 25 puta biomase pozadinskih bakterija (većinom sastavljenih od formi otpornih na grejzing) prisutnih u inkubiranom uzorku HNF.

Za svaku lokaciju, tjedan prije eksperimenta, pripremljene su i označene Erlenmayerove tikvice od 500 ml i u njih se dodavalo sljedeće (Slika 9):

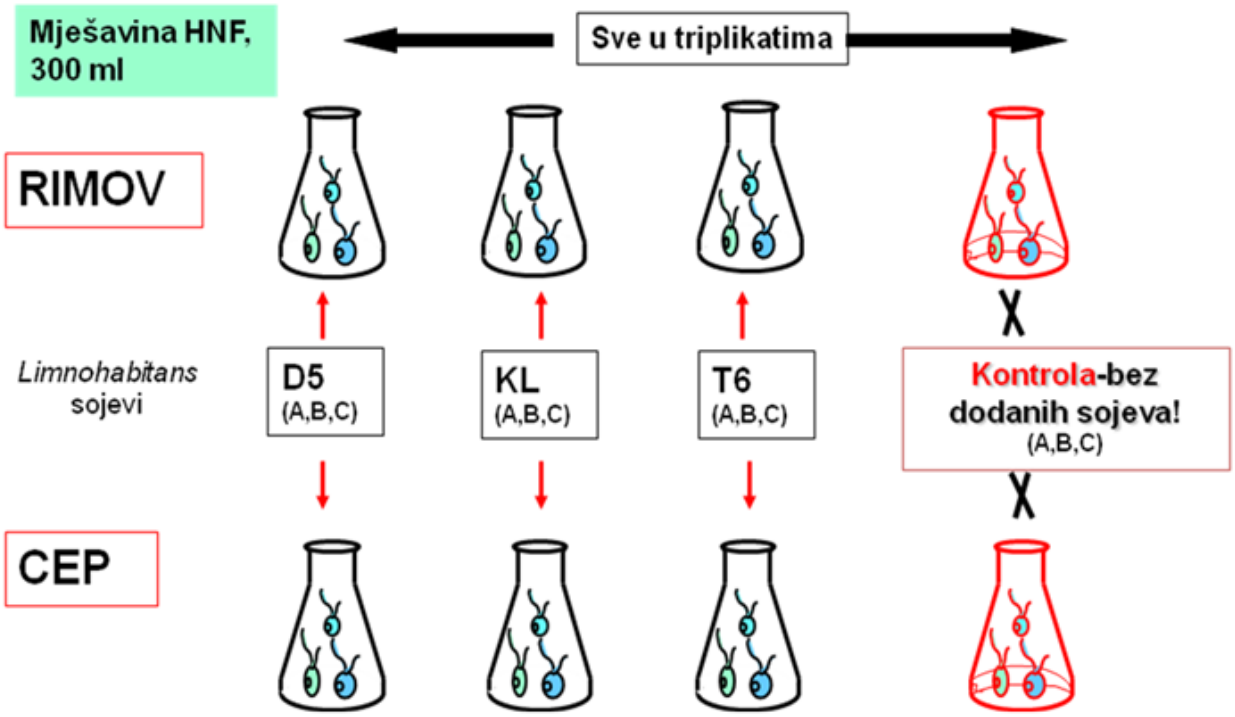
- Rim – Con - A ; Rim – Con - B ; Rim – Con - C (300 ml mješavine vode sa HNF prije dodavanja bakterija, služi kao kontrola)
- Rim – D5 – A ; Rim – D5 – B ; Rim – D5 – C (300 ml mješavine vode sa HNF + soj D5)

- Rim – Kl – A ; Rim – Kl – B ; Rim – Kl – C (300 ml mješavine vode sa HNF + soj Kl)
- Rim – T6 – A ; Rim – T6 – B ; Rim – T6 – C (300 ml mješavine vode sa HNF + soj T6)
- Cep – Con - A ; Cep – Con - B ; Cep – Con - C (300 ml mješavine vode sa HNF prije dodavanja bakterija, služi kao kontrola)
- Cep – D5 – A ; Cep – D5 – B ; Cep – D5 – C (300 ml mješavine vode sa HNF + soj D5)
- Cep – Kl – A ; Cep – Kl – B ; Cep – Kl – C (300 ml mješavine vode sa HNF + soj Kl)
- Cep – T6 – A ; Cep – T6 – B ; Cep – T6 – C (300 ml mješavine vode sa HNF + soj T6)

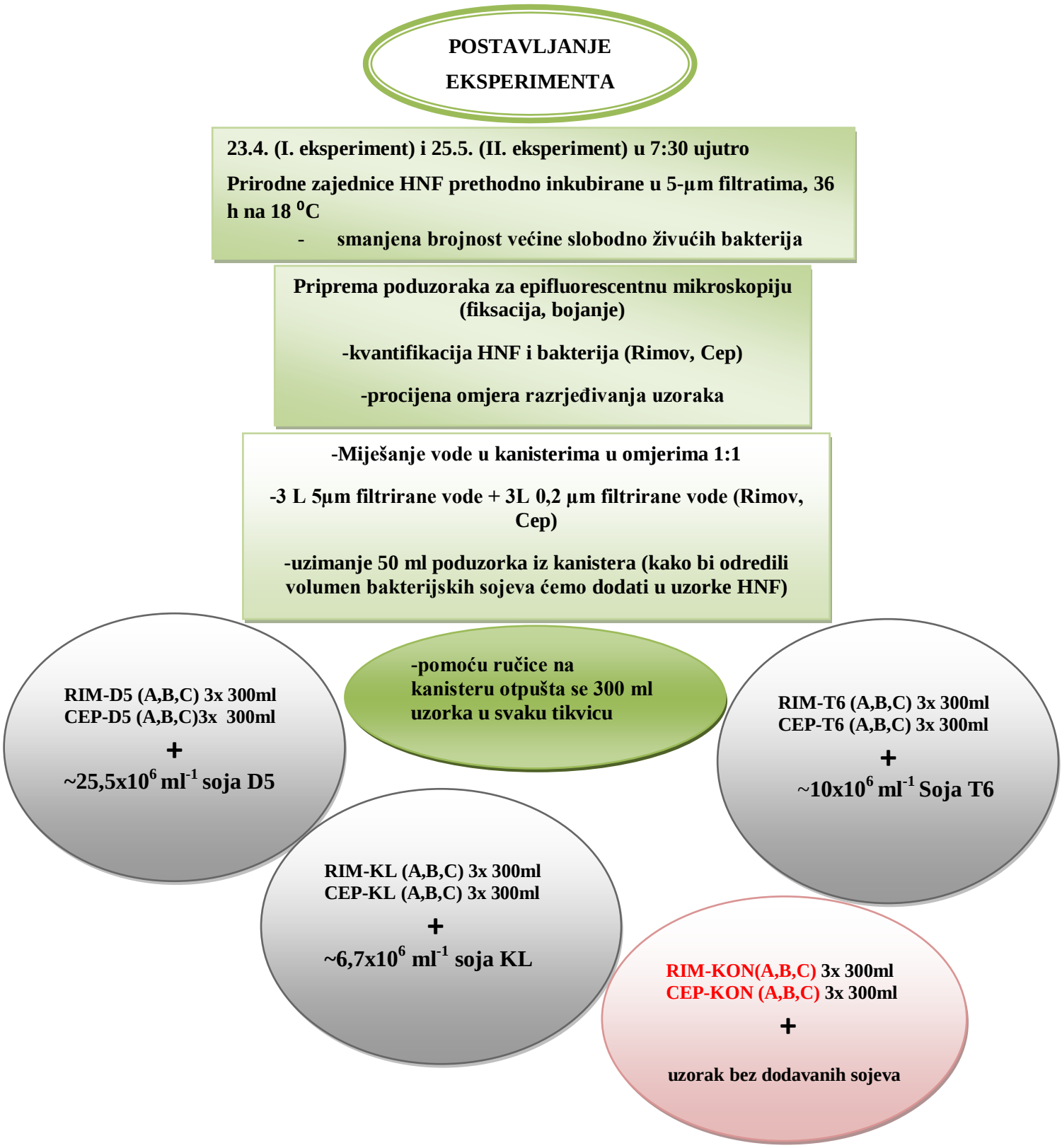
Svi tretmani u Erlenmayerovim tikvicama inkubirani su u mraku na 18 °C. Svi poduzorci uzimali su se u sterilnim uvijetima, u laminaru, u vremenskim razmacima od 12-24 sata (prikazano slikom 11.). Svaki poduzorak fiksiran je formaldehidom, obojan sa DAPI i pomoću epifluorescentnog mikroskopa određen je broj baterija i HNF. Dakle pratilo se povećanje broja HNF i smanjenje broja bakterijskog plijena.



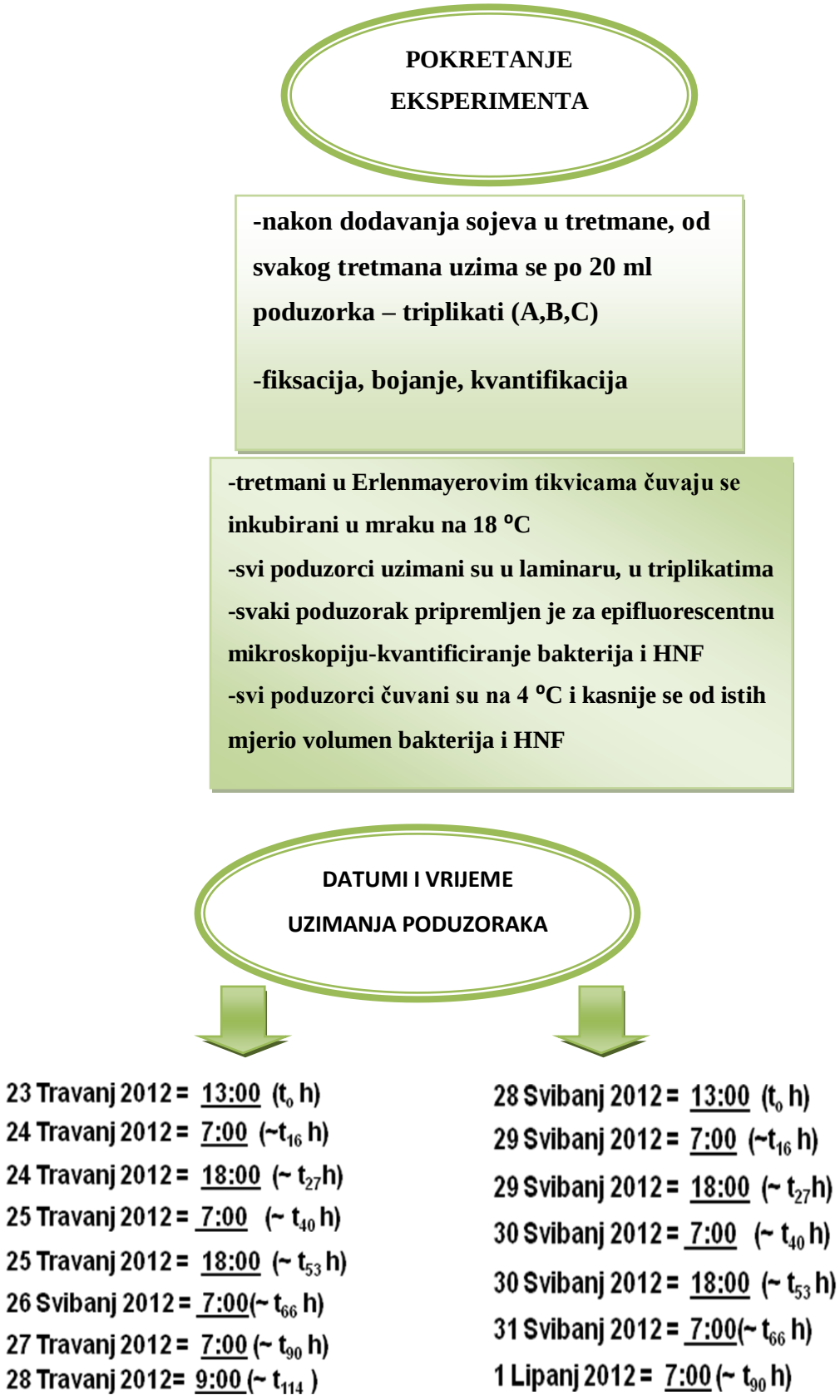
Slika 8. Kanister s pumpicom



Slika 9. Tretmani u Erlenmayerovim tikvicama



Slika 10. Prikaz procedure postavljanja eksperimenta



Slika 11. Prikaz eksperimentalnog postupka

3.6. Kvantifikacija i biomasa bakterijskih stanica

Poduzorci su uzimani u rasponu kako je to predočeno Slikom 11.

Nakon fiksacije formaldehidom (2% konačna koncentracija vol/vol, npr. 5 ml 40%-tnog formaldehida u 100 ml uzorka) uzimano je 5-10 ml od poduzorka (ovisno o brojnosti) i filtrirano kroz pore veličine 0,2 μm crnog polikarbonatnog filtera (Poretics or Nucleopore), obojano sa DAPI (konačna koncentracija 0,2 μg ml^{-1}) kako je prethodno opisano. Bakterijske stanice kvantificirane su epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX 60), brojano je otprilike 400-500 stanica na povećanju 1000x. Broj bakterijskih stanica u mililitru računao se prema prethodno navedenoj formuli, a kao konačan broj bakterija u uzorku uzimala se srednja vrijednost triplikata.

Bakterijske stanice mjerene su pomoću poluautomatskog sistema analize fotografija (Lucia 3.52; rezolucija 750 po 520 piksela, 256 razina sive [Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic]). Fotografije su snimane analognom monokromnom kamerom (Cohu Inc. San Diego, California) koja je priključena na mikroskop i spojena s računalom. Za svaki poduzorak uslikano je 10 fotografija sa slučajno odabranog područja na filteru i mjerena je veličina baterijskih stanica. Dimenzije koje su mjerene kod baterija su dužina i širina. Dimenzije su prenesene u Excell (Microsoft) gdje se računao volumen bakterijskih stanica. Formula za volumen je slijedeća:

$$\mathbf{V=(W^3/6x\pi) + (L-W)\ x\ (W^2/4x\pi)}$$

gdje je V volumen, W širina a L dužina bakterijske stanice. Ova formula koristi se za sve oblike bakterijskih stanica.

Bakterijska biomasa računala se prema alometričkoj vezi između staničnog volumena (V) i sadržaja ugljika (C), što je metoda prema Norlandu (1993).

$$\mathbf{C=120\ X\ V^{0.72}}\ \text{(fg po stanici)}$$

3.7. Kvantifikacija, biovolumen i parametri mjerenja rasta heterotrofnih bičaša

Od istih poduzoraka koji su uzimani u rasponu vremena kako je to prikazano Slikom 11 nakon fiksacije uzimano je od 5 do 10 ml (ovisno o brojnosti), filtrirano kroz pore veličine 1 μm crnog polikarbonatnog filtera (Poretics or Nucleopore) te obojano sa DAPI, kako je prethodno opisano. Brojnost je determinirana epifluorescentnom mikroskopijom. Broj HNF po mililitru računao se prema istoj formuli kao i za bakterije, a kao konačna vrijednos HNF u uzorku uzimana je srednja vrijednost triplikata.

Kako bi se izračunao srednji volumen stanica HNF, za svaki poduzorak, mjerena je dužina i širina 100 stanica u triplikatima. Mjerenje je obavljano ručno, na digitalnim fotografijama pomoću računalnog programa (Lucia 3.52; rezolucija 750 po 520 piksela, 256 razina sive [Laboratory Imaging, Prague, Czech Republic]) snimljenih pomoću analogne monokromne kamere (Cohu Inc. San Diego, California) priključene na mikroskop.

Formula za volumen HNF je zapravo formula za izduženi elipsoid:

$$\mathbf{V=4/3\pi a^2 b}$$

gdje je V volumen, a širina i b dužina HNF.

Za procjenu biomase korišten je faktor konverzije od 220 fg C μm^{-3} (Borsheim i Bratbak 1987).

Specifična stopa rasta (μ) izračunata je iz promjene brojnosti HNF upotrebljavajući linearnu jednadžbu za eksponencijalni rast:

$$\mathbf{\ln N_t = \ln N_0 + \mu \times t}$$

Gdje je N_t brojnost HNF (stanice ml^{-1}) u vremenu t (dan), μ je specifična stopa rasta (dan^{-1}) i $\ln N_0$ križanje najbolje odgovarajuće linije sa osi y (stanice ml^{-1}), ln je prirodni logaritam. Parametri μ i N_0 određeni su linearnom regresijom. Specifična stopa rasta zapravo predstavlja broj dijeljenja po stanici u jedinici vremena.

Procjena prinosa rasta HNF, u smislu brojnosti, izračunata je prema slijedećoj formuli:

Prinost rasta (%) = (najveća postignuta brojnost HNF – brojnost HNF u vremenu t_0) x 100.

Lag faza izračunata je kao period od vremena t_0 do križanja između najbolje odgovarajuće linije rasta HNF i nultog vremena razine HNF. Lag faza je faza u kojoj nema rasta već se organizmi prilagođavaju novonastalim uvjetima.

3.8. Kemijski parametri

Voda sa svakoga lokaliteta podvrgnuta je kemijskoj analizi. Kako je prethodno navedeno po 1,5 litara vode sa svakoga lokaliteta poslana je na kemijsku analizu. Analiza se radila u laboratoriju za hidrokemiju i ekosistemsko modeliranje Hidrobiološkoga instituta u Českim Budejovicama.
Analiziran je otopljeni organski ugljik (DOC) na Shimadzu TOC-5000A uređaju za analizu. Spektrofotometrijski je određen totalni i rekativni otopljeni fosfor prema metodi prethodno opisanoj od strane Kopaček i Hejzlar (1993).

3.9. Obrada podataka

Svi podatci obrađivani su pomoću programa Excell (Microsoft) te pomoću programa Sigma Plot (Systac software Inc.).

4. REZULTATI

4.1. Kemijska analiza vode

Kemijska analiza vode iz Rimov-a pokazuje koncentraciju DOC (otopljenog organskog ugljika) od 4,88 mg/L, koncentraciju totalnog otopljenog fosfora od 21,7 µg/L i reaktivnog fosfora od 11,6 µg/L u travnju. U svibnju je koncentracija DOC bila 4,45 mg/L, koncentracija totalnog otopljenog fosfora bila je 12 µg/L a koncentracija reaktivnog fosfora 7,9 µg/L. Kemijska analiza vode za Cep pokazuje koncentraciju DOC (otopljenog organskog ugljika) od 3,92 mg/L, koncentraciju totalnog otopljenog fosfora od 8,6 µg/L i reaktivnog fosfora od 5,2 µg/L u travnju. U svibnju koncentracija DOC bila je 4,43 mg/L, koncentracija totalnog otopljenog fosfora 10 µg/L i reaktivnog fosfora 5,4 µg/L (Tablica 3).

Tablica 3. Koncentracije DOC, TP I RP u Rimov-u i Cep-u tri dana prije početka svakoga eksperimenta

Lokalitet zorkovanja	Dubina	Datum	DOC mg/L	TP µg/l	RP µg/l
CEP	Površinski sloj	20.4.2012	3,92	8,6	5,2
RIMOV	Površinski sloj	20.4.2012	4,88	21,7	11,6
CEP	Površinski sloj	25.5.2012	4,43	10	5,4
RIMOV	Površinski sloj	25.5.2012	4,45	12	7,9

4.2. Rast heterotrofnih bičaša kao odgovor na bakterijski plijen

Porast brojnosti heterotrofnih bičaša, tijekom razdoblja ovoga istraživanja, predstavlja jednu od glavnih osnova prema kojoj se zaključivalo o nutritivnoj kvaliteti ponuđenih bakterijskih sojeva. Heterotrofnim bičašima bila su ponuđena 3 soja bakterija roda *Limnohabitans* te je

praćeno povećanje njihove brojnosti u usporedbi s kontrolom gdje nema dodanih sojeva. Kako bi se utvrdilo da je pad ili porast brojnosti značajan, obavljan je jednostavni t-test usporedbe dviju brojnosti. Kako bi zaključili na kojem soju heterotrofni bičaši najbolje rastu računala se specifična stopa rasta, dužina lag faze i postotak prinosa heterotrofnih bičaša u smislu brojnosti. Uzorci u kojima se promatralo povećanje brojnosti bili su prikupljeni, kako je ranije navedeno, na dva različita lokaliteta tijekom dva eksperimenta u različitim vremenskim razdobljima.

Kao što je i očekivano, heterotrofni bičaši pokazuju rast na sva tri ponuđena soja u usporedbi sa kontrolom gdje nije zabilježen veći rast.

4.2.1. I. Eksperiment (23. travanja do 28. travnja 2012.)

4.2.1.1. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova

Početna brojnost HNF u svim tretmanima iznosila je 3,151 x 10^3 ml^{-1} jer su u tretmane dodavani isti uzorci vode sa lokaliteta Rimov. Početni broj bakterija u tretmanima razlikovao se, jer su one dodane u tretmane u različitoj brojnosti kako bi kompenzirali njihov različit prosječan volumen stanica i doprinjeli približno istom početnom biovolumenu u svim tretmanima.

U tretmanu D5 gdje je početna brojnost bakterija iznosila 26,097 x 10^6 ml^{-1} u roku od 66 sati heterotrofni bičaši uspjeli su je smanjiti na gotovo duplo manju, koja je iznosila 11,101 x 10^6 ml^{-1} i statistički je značajno različita od početne vrijednosti ($p<0,01$), a već slijedeći dan ta je vrijednost pala na vrijednosti slične onima koje su zabilježene u kontrolnim uzorcima i iznosila je 1,780 x 10^6 ml^{-1} ($p<0,001$). Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 66 sati i iznosila je 58,905 x 10^3 ml^{-1} što se značajno razlikuje od početnih vrijednosti ($p<0,001$).

U tretmanu KL početna brojnost bakterija iznosila je 8,820 x 10^6 ml^{-1}. Tijekom slijedećih 53 sata eksperimenta brojnost bakterija se lagano povećavala (statistički nije značajno, $p>0,05$) da bi nakon 66 sati počela padati te nakon 90 sati dosegla vrijednost od 2,624 x 10^6 ml^{-1} ($p<0,001$), što je slično i vrijednostima zabilježenim u kontrolnom uzorku. Najveću brojnost

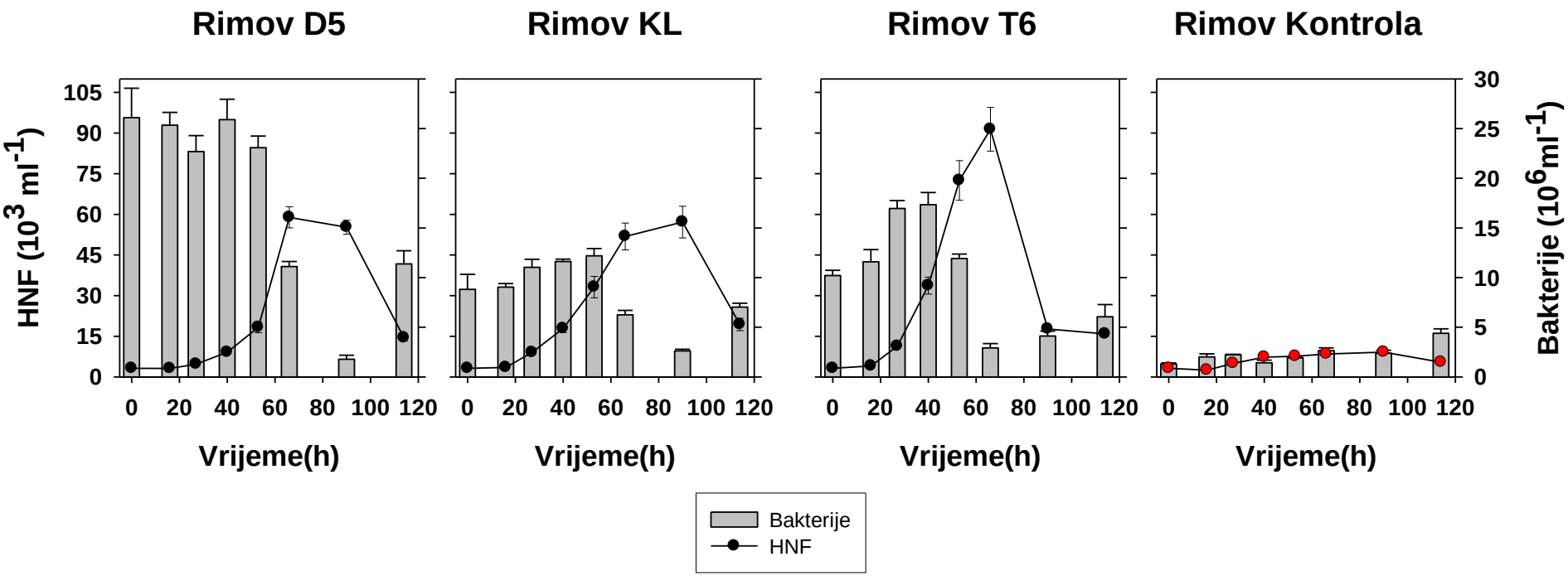
heterotrofni bičaši postižu nakon 90 sati, 57,154 x 10^3 ml^{-1}, što odgovara i najnižoj brojnosti bakterija u tom vremenu i statistički je vrlo značajno povećanje u odnosu na početnu vrijednost ($p<0,001$).

U tretmanu T6 početna brojnost bakterija iznosila je 10,207 x 10^6 ml^{-1}. Tijekom slijedećih 40 sati eksperimenta bakterije pokazuju lagan porast (statistički nije značajno $p>0.05$) u brojnosti te nakon 53 sata počinju lagano opadati, da bi nakon 66 sati dostigle najmanju brojnost, 2,911 x 10^6 ml^{-1}, koja je slična brojnosti kontrolnih uzoraka, što je značajan pad u odnosu na početnu brojnost ($p<0,001$). Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 91, 405 x 10^3 ml^{-1} što je vrlo značajno povećanje u odnosu na početnu brojnost ($p<0,001$).

Svi navedeni rezultati prikazani su Tablicom 4. i Slikom 12.

Tablica 4. Brojnost heterotrofinih bičaša i bakterija u određenim tretmanima (D5, KL, T6 i KONTROLA) u određenom vremenu i danu eksperimenta. Vrijednosti koje su prikazane u tablici su srednje vrijednosti triplikata i standardna devijacija. Sivom bojom označene su najviše zabilježene brojnosti heterotrofnih bičaša i najniže zabilježene brojnosti bakterija kod sva tri testirana soja.

Datumi i sat uzimanja poduzoraka (RIMOV)	Vrijeme (h)	HNF-D5 $10^3 ml^{-1}$	BAKT-D5 $10^6 ml^{-1}$	HNF-KL $10^3 ml^{-1}$	BAKT-KL $10^6 ml^{-1}$	HNF-T6 $10^3 ml^{-1}$	BAKT-T6 $10^6 ml^{-1}$	HNF-KON $10^3 ml^{-1}$	BAKT-KON $10^6 ml^{-1}$
23.4., 15.00	t_0	3,151 ±0,337	26,097 ±2,958	3,151 ±0,337	8,820 ±1,506	3,151 ±0,337	10,207 ±0,524	3,151 ±0,337	1,300 ±0,107
24.4., 7.00	t_{16}	3,103 ±0,410	25,343 ±1,283	3,473 ±0,227	9,044 ±0,360	4,022 ±0,185	11,591 ±1,220	2,506 ±0,210	2,020 ±0,292
24.4., 19.00	t_{27}	4,682 ±0,266	22,684 ±1,604	9,071 ±0,547	11,030 ±0,811	11,288 ±0,309	16,953 ±0,798	4,979 ±0,406	2,235 ±0,043
25 4., 7.00	t_{40}	9,114 ±0,627	25,902 ±2,051	17,827 ±1,451	11,621 ±0,234	33,693 ±3,152	17,327 ±1,228	7,286 ±0,538	1,425 ±0,259
25 4., 18.00	t_{53}	18,287 ±1,967	23,076 ±1,170	33,120 ±3,959	12,187 ±0,733	72,513 ±7,326	11,920 ±0,445	7,634 ±0,786	1,906 ±0,157
26.4., 7.00	t_{66}	58,905 ±3,887	11,101 ±0,517	51,842 ±4,952	6,251 ±0,449	91,405 ±8,073	2,916 ±0,437	8,429 0,863	2,649 ±0,263
27.4., 7.00	t_{90}	55,258 ±2,583	1,780 ±0,402	57,154 ±5,850	2,624 ±0,152	17,676 ±0,924	4,111 ±0,506	9,165 ±0,649	2,371 ±0,307
28.4., 7.00	t_{114}	14,462 ±1,261	11,384 ±1,311	19,356 ±2,274	7,035 ±0,380	15,872 ±0,995	6,046 ±1,240	5,427 ±0,424	4,385 ±0,455



Slika 12. Grafički prikaz pada brojnosti bakterija i porasta brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL, T6 i kontroli. Iz navedenih rezultata može se vidjet kako je brojnost bila najveća u tretmanu T6, nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 91,405 x 10^3 ml^{-1} zatim, u tretmanu D5 gdje je brojnost nakon istog vremena bila 58,905 x 10^3 ml^{-1}. U tretmanu KL brojnost se pokazala najvećom nakon 90 sati i iznosila je 57,154 x 10^3. U kontrolnom uzorku, koji je na slici prikazan crvenom bojim, brojnost HNF se nije značajno mjenjala tijekom cijeloga eksperimenta ($p>0,05$, One way ANOVA). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost triplikata, a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

4.2.1.2. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti HNF u tretmanima iz Cepa

Početna brojnost HNF u svim tretmanima iznosila je 4,062 x 10^3 ml^{-1} jer su u tretmane dodavani isti uzorci vode sa lokaliteta Cep. Početni broj bakterija u tretmanima razlikovala se kako je navedeno u prethodnom poglavlju.

U tretmanu D5 početna brojnost bakterija iznosila je 25,899 x 10^6 ml^{-1}. Prvih 40 sati eksperimenta brojnost se ne mijenja statistički značajno ($p>0,05$), da bi nakon 66 sati drastično pala te je nakon 90 sati eksperimenta iznosila 1,153 x 10^6 ml^{-1} što je značajno manje od početne brojnosti ($p<0,001$). Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nako 90 sati eksperimenta i iznosila je 42,976 x 10^3 ml^{-1} što je značajno više nego na početku ($p<0,001$).

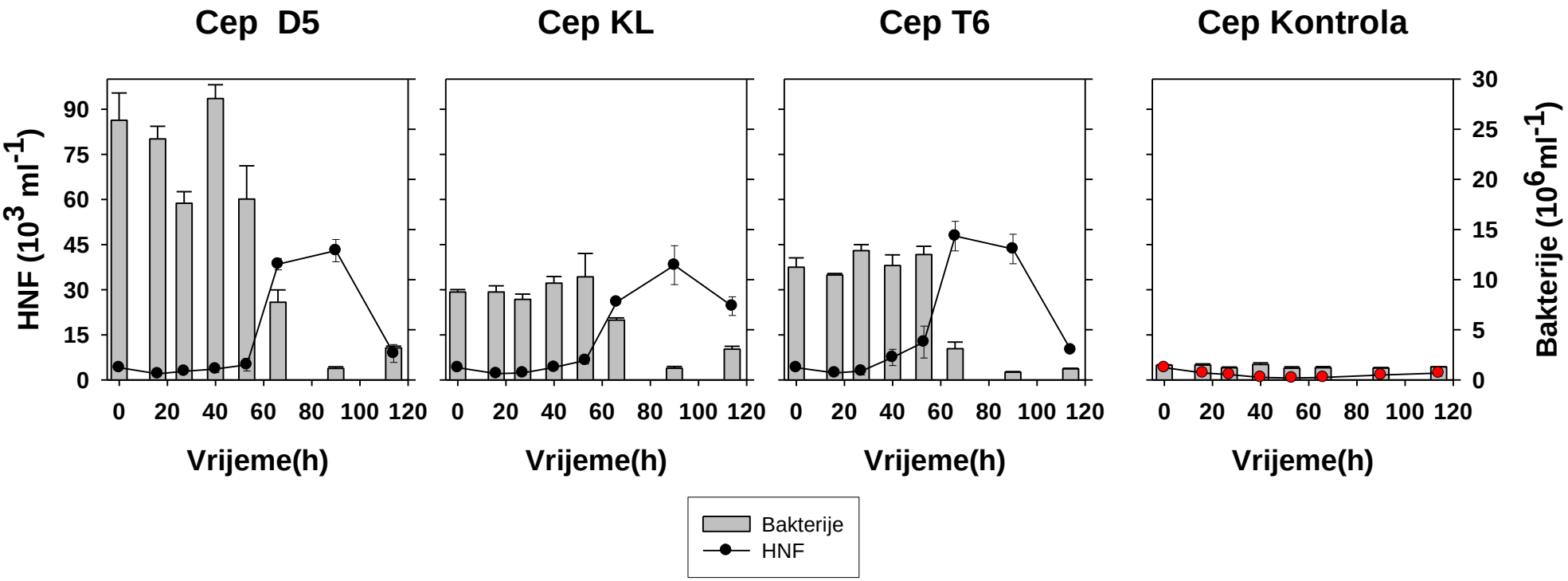
U tretmanu KL početna brojnost bakterija bila je 8,762 x10^6 ml^{-1}. Prvih 53 sata eksperimenta nije zabilježena velika promjena brojnosti bakterija (statistički nije značajna, $p>0,05$) da bi nakon 66 sati brojnost počela padati te nakon 90 sati dosegla najnižu brojnost od 1,167 x 10^6 ml^{-1} što je statistički značajno drugačije od početne vrijednosti bakterija ($p<0,001$). Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 90 sati eksperimenta i iznosila je 38,139 10^3 ml^{-1}, što je značajno povećanje u odnosu na početnu brojnost ($p<0,01$).

U tretmanu T6 početna brojnost bakterija iznosila je 11,236 x 10^6 ml^{-1}. Prvih 53 sata eksperimenta nije zabilježena veća promjena u brojnosti bakterija (statistički nije značajno $p>0,05$) da bi nakon 66 sati brojnost počela padati i iznosila je 3,120 x 10^6 ml^{-1} (statistički vrlo značajno, $p<0,01$). Nakon 90 sati eksperimenta zabilježena je najniža brojnost i iznosila je 0,772 x 10^6 ml^{-1} što je značajno manje u odnosu na početnu brojnost ($p<0,001$). Najveća brojnost heterotrofinh bičaša zabilježena je nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 47,802 10^3 ml^{-1} (statistički vrlo značano u odnosu na početnu brojnost, $p<0,01$).

Svi navedeni rezultati prikazani su Tablicom 5. i Slikom 13.

Tablica 5. Brojnost heterotrofinh bičaša i bakterija u određenim tretmanima (D5, KL, T6 i KONTROLA) u određenom vremenu i danu eksperimenta. Vrijednosti koje su prikazane u tablici su srednje vrijednosti triplikata i standardna devijacija. Sivom bojom označene su najviše zabilježene vrijednosti heterotrofnih bičaša i najniže zabilježene vrijednosti bakterija kod sva tri testirana soja.

Datumi i sat uzimanja poduzoraka (CEP)	**Vrijeme (h)**	**HNF-D5** $10^3 ml^{-1}$	**BAKT-D5** $10^6 ml^{-1}$	**HNF-KL** $10^3 ml^{-1}$	**BAKT-KL** $10^6 ml^{-1}$	**HNF-T6** $10^3 ml^{-1}$	**BAKT-T6** $10^6 ml^{-1}$	**HNF-KON** $10^3 ml^{-1}$	**BAKT-KON** $10^6 ml^{-1}$
23.4., 15.00	t_0	4,062 ±0,241	25,899 ±2,713	4,062 ±0,241	8,762 ±0,243	4,062 ±0,241	11,236 ±0,942	4,062 ±0,241	1,456 ±0,056
24.4., 7.00	t_{16}	2,033 ±0,689	24,040 ±1,254	2,089 ±0,444	8,770 ±0,606	2,311 ±0,673	10,466 ±0,152	2,326 ±0,289	1,480 ±0,124
24.4., 19.00	t_{27}	2,870 ±0,650	17,610 ±1,162	2,316 ±0,568	8,029 ±0,530	2,930 ±1,266	12,894 ±0,599	1,766 ±0,095	1,203 ±0,083
25 4., 7.00	t_{40}	3,640 ±1,191	28,053 ±1,388	4,191 ±0,902	9,657 ±0,651	7,466 ±2,689	11,401 ±1,065	0,845 ±0,224	1,536 ±0,164
25 4., 18.00	t_{53}	5,050 ±2,071	18,044 ±3,310	6,468 ±1,183	10,290 ±2,311	12,584 ±5,287	12,507 ±0,817	0,642 ±0,243	1,166 ±0,143
26.4., 7.00	t_{66}	38,455 ±1,900	7,744 ±1,236	25,885 ±0,549	5,956 ±0,237	47,802 ±4,915	3,120 ±0,654	0,802 ±0,362	1,209 ±0,114
27.4., 7.00	t_{90}	42,976 ±3,696	1,153 ±0,157	38,139 ±6,482	1,167 ±0,171	43,529 ±4,880	0,772 ±0,056	1,605 ±0,627	1,170 ±0,069
28.4., 7.00	t_{114}	8,780 ±2,973	3,183 ±0,191	24,526 ±3,117	3,073 ±0,285	9,999 ±0,325	1,098 ±0,065	2,300 ±1,024	1,301 ±0,013



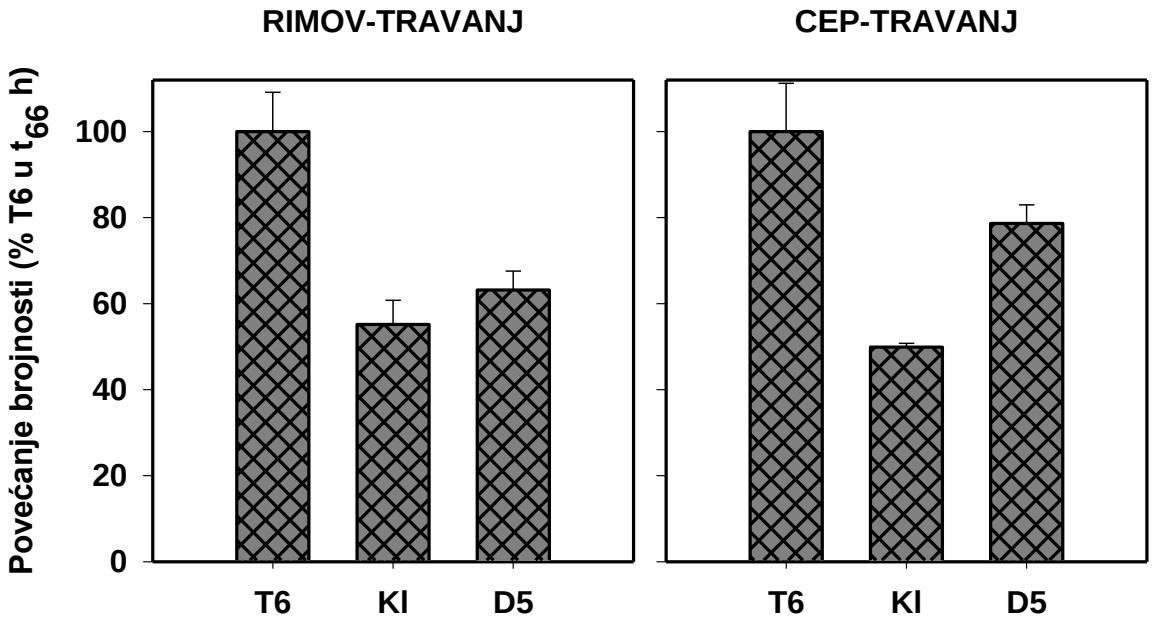
Slika 13. Grafički prikaz pada brojnosti bakterija i porasta brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL, T6 i kontroli. Iz navedenih rezultata može se vidjet kako je brojnost bila najveća u tretmanu T6, nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 47,802 x 10^3 ml^{-1} . U tretmanima gdje se nalazio soj D5 najveća brojnost zabilježena je nakon 90 sati i iznosila je 42,976 x 10^3 ml^{-1}, a najveća brojnost u tretmanu KL zabilježena je nakon istog broja sati i iznosila je 38,139 x 10^3 ml^{-1}. U kontrolnom uzorku, koji je na slici prikazan crvenom bojom, brojnost se nije značajno mjenjala tijekom cijeloga eksperimenta (One way ANOVA p>0,05). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

4.2.1.3. Prirast brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa

Ako pogledamo podatke o brojnosti heterotrofnih bičaša (Tablica 4. i Tablica 5.) možemo zaključiti kako je najviša brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena kod soja T6, u tretmanima s oba lokaliteta, i to nakon 66 sati eksperimenta ili u vremenu t_{66}. Brojnost u uzorcima iz Rimova u navedenom vremenu iznosila je 91,405 x 10^3 ml^{-1}, a u uzorcima iz Cepa 47,802 x 10^3 ml^{-1}. Prema ovim vrijednostima izračunat je postotak prinosa brojnosti heterotrofinh bičaša koji je prikazan Slikom 12. Soj T6, na lokalitetu Rimov, u vremenu t_{66} pokazuje 100%-tni prirast brojnosti, a u odnosu na njega soj D5 pokazuje prirast od 63% a soj KL 55%. Soj T6, na lokalitetu Cep, u vremenu t_{66}, također pokazuje 100%-tni prirast brojnosti, a u odnosu na njega soj D5 pokazuje prirast od 49% a soj KL 78%.
Univarijantna analiza varijance (One-way ANOVA, popraćena Tukey testom) pokazala je kako je brojnost heterotrofnih bičaša, u vremenu t_{66}, između tretmana s oba lokaliteta značajno različita ($p<0,001$). Rezultati Tukey testa prikazani su Tablicom 6.

Tablica 6. Rezultati Tukey testa, crna boja pokazuje kako razlike u brojnosti između tretmana, u vremenu t_{66}, nisu statistički značajne a siva da postoje statistički značajne razlike (q=6,10, HSD=11,705). Možemo zaključiti iz navedenih rezultata kako se tretman T6 iz Rimova statistički razlikuje od svih tretmana.

USPOREĐIVANI TRETMANI	D5-Rim	KL-Rim	T6-Rim	D5-Cep	KL-Cep
D5-Rim					
KL-Rim					
T6-Rim					
D5-Cep					
KL-Cep					
T6-Cep					



Slika 14. Grafički prikaz povećanja brojnosti heterotrofnih bičaša koji su rasli na različitim bakterijskim sojevima. Postotak je izražena s obzirom na brojnost heterotrofnih bičaša, kod soja T6, gdje je zabilježena najveća brojnost tijekom eksperimenta, u vremenu t_{66}. Prikazane vrijednosti su srednja vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

4.2.1.4. Specifična stopa rasta i duljina lag faze heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa

Specifična stopa rasta definira se kao povećanje stanične mase u jedinici vremena, znači brzina rasta. Lag faza definira se kao faza mirovanja, faza kada su se organizmi našli u novom mediju i prilagođavaju se novoj situaciji. Interval rasta govori nam u kojem periodu vremena je zabilježen eksponencijalni rast heterotrofnih bičaša. Specifični faktor rasta, dužina lag faze i interval rasta određeni su linearnom regresijom.

Prema dobivenim rezultatima najduža lag-faza zabilježena je, osim u kontrolama, kod tretmana D5 iz Rimova i iznosila je 23,2 sata. Tretmani sa lokaliteta Rimov pokazuju kraće lag-faze u odnosu na one sa lokaliteta Cep. Najkraća lag-faza zabilježena kod tretmana sa oba lokaliteta, bila je u prisustvu soja T6 i znosila je 12,9 sati za Rimov i 28,5 sati za Cep.

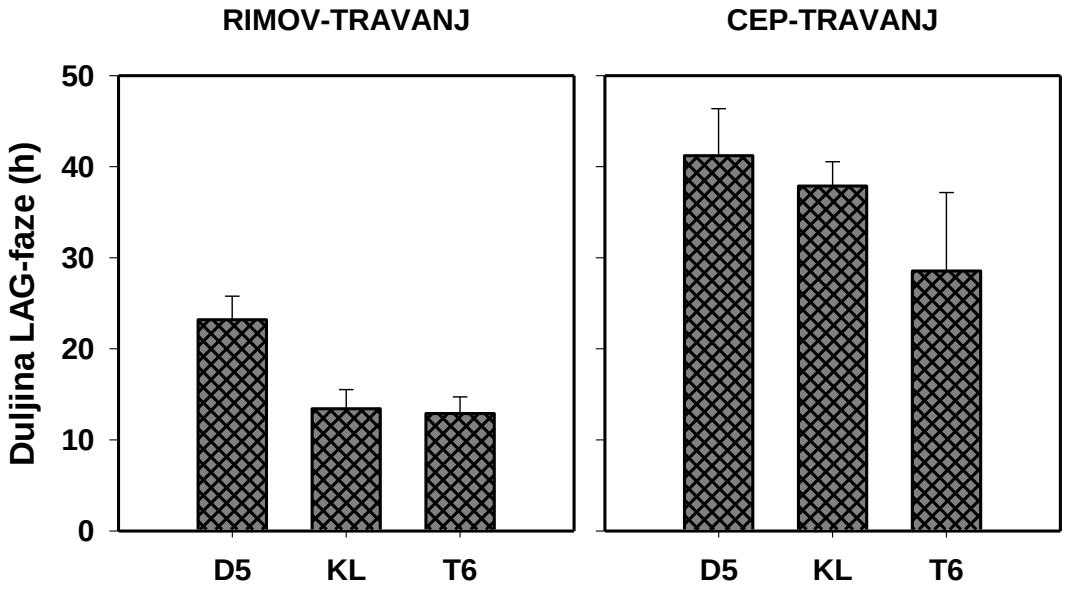
Specifična stopa rasta, osim u kontrolama, bila je najmanja u KL tretmanima s oba lokaliteta. Najveća stopa rasta zabilježena je kod tretmana iz Rimova u prisustvu soja T6 i iznosila je 2,120 dan^{-1}, a kod tretmana iz Cepa u prisustvu soja D5 i iznosila je 2,209 dan^{-1}.
Interval rasta za sve tretmane iz Rimova, osim za D5, bio je od 16-40 sati eksperimenta. Interval rasta za D5 bio je nešto duži i iznosio je 37-63 sata. Interval rasta za sve tretmane iz Cepa bio je od 40-66 sati. Kontrolni uzorak iz Cepa pokazuje interval od 53-90 sati.
Univarijantna analiza varijance (One-way ANOVA), popraćena Tukey testom (Tablica 9.), pokazala je da su razlike između duljina lag-faza heterotrofnih bičaša u ponuđenim sojevima statistički vrlo značajne ($P<0,001$).
Univarijantna analiza varijance (One-way ANOVA), pokazala je da su razlike između specifične stope rasta heterotrofnih bičaša u ponuđenim sojevima statistički značajne ($P<0,01$).
Svi navedeni rezulati prikazani su Tablicom 7., Slikom 15. i Slikom 16.

Tablica 7. Rezultati Tukey testa, crna boja pokazuje kako razlike u dužini lag faze između testiranih tretmana nisu statistički značajne dok siva pokazuje statističku značajnost (q=6,10 HSD=18,379). Prema navedenim rezultatima možemo zaključiti kako postoji razlika u duljini lag faze između lokaliteta.

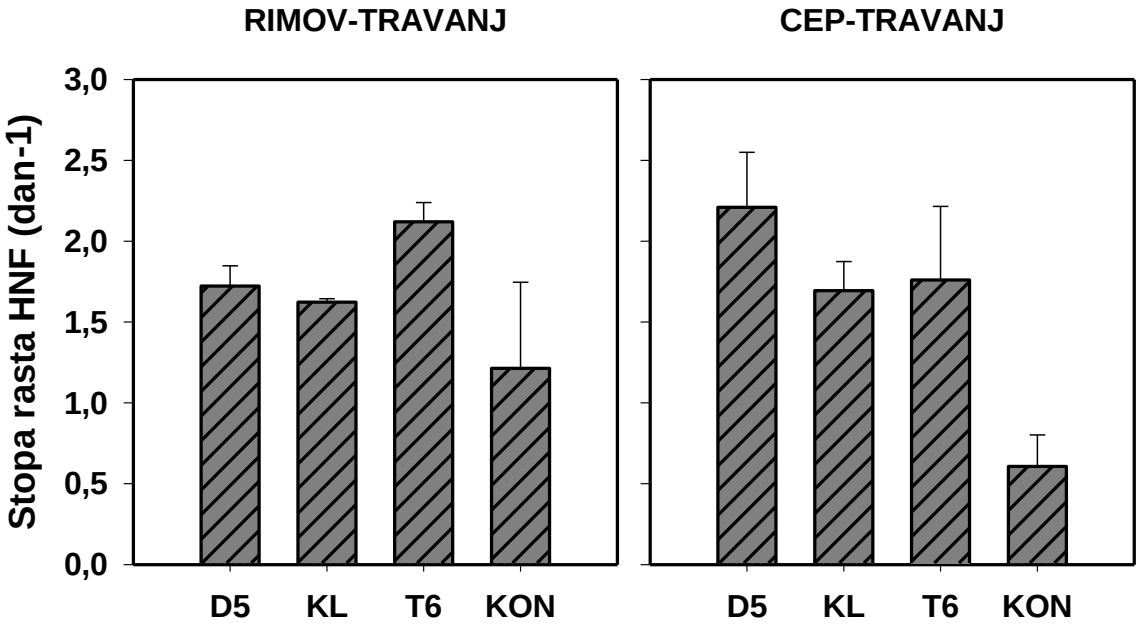
USPOREĐIVANI TRETMANI	**Rim-D5**	**Rim-KL**	**Rim-T6**	**Cep-D5**	**Cep-KL**
Rim-D5					
Rim-KL					
Rim-T6					
Cep-D5					
Cep-KL					
Cep-T6					

Tablica 8. U tablici su prikazane vrijednosti specifične stope rasta, lag-faze i intervala rasta navedenih tretmana iz Rimova i Cepa. Prikazane vrijednosti srednja su vrijednost triplikata.

Sojevi	Interval (h)	μ (h^{-1})	μ (dan^{-1})	LAG (h)
D5-RIM	37-63	0,072	1,723	23,2
KL-RIM	16-40	0,068	1,623	13,4
T6-RIM	16-40	0,088	2,120	12,9
KON-RIM	16-40	0,038	1,213	17,3
D5-CEP	40-66	0,092	2,209	41,2
KL-CEP	40-66	0,071	1,694	37,9
T6-CEP	40-66	0,073	1,760	28,5
KON-CEP	53-90	0,025	0,607	123,3



Slika 15. Grafički prikaz duljina lag-faza heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL i T6. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.



Slika 16. Grafički prikaz specifične stope rasta heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL, T6 i KON u ovisnosti o vremenu. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost triplikata, a zastavice standardnu devijaciju.

4.2.1.5. Promjene u biomasi bakterija i heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa

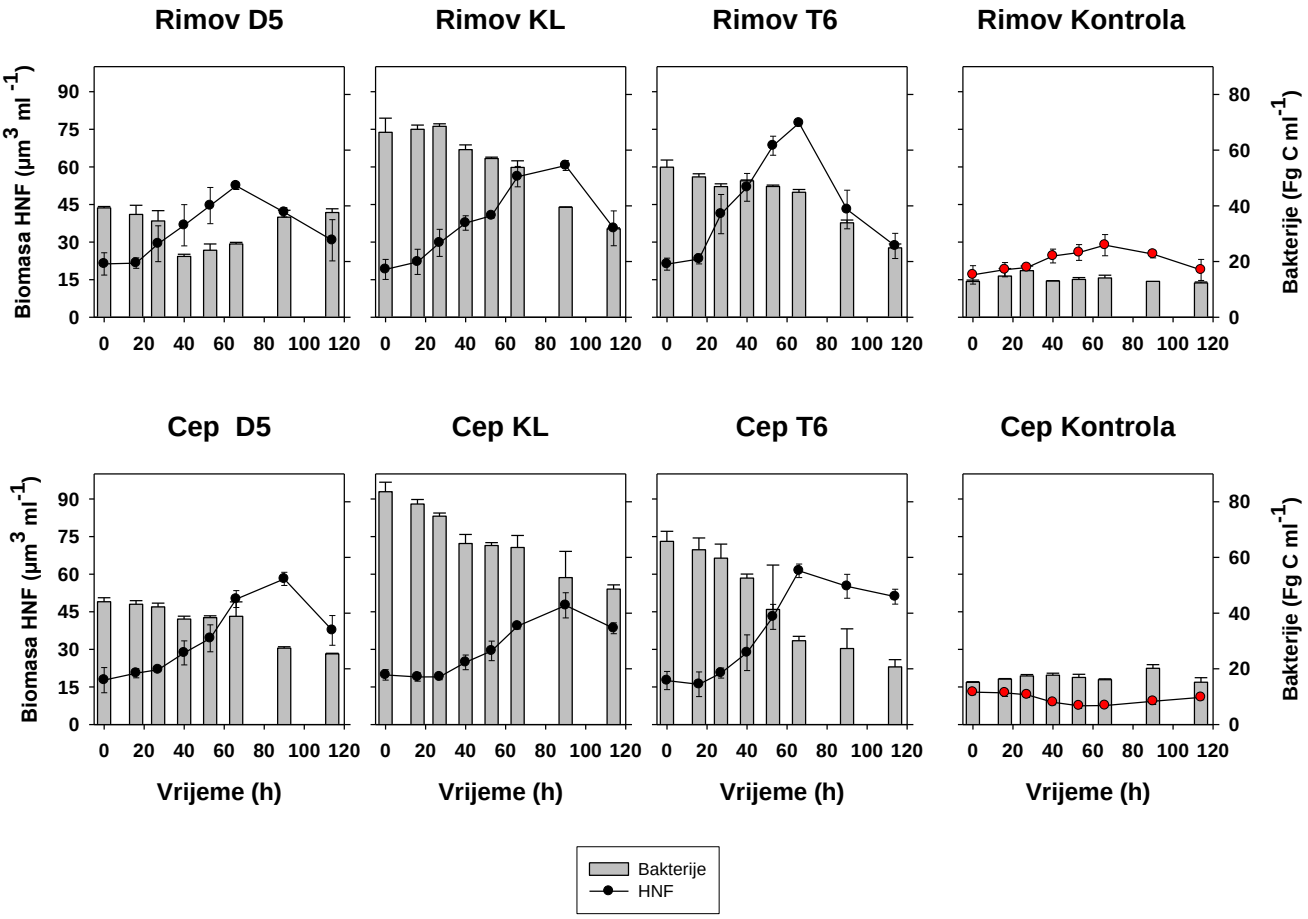
Rezulati biomase, kao i rezultati brojnosti pokazuju smanjenje biomase bakterija i povećanje biomase heterotrofnih bičaša. Razultati prikazani Tablicom 9. i Tablicom 10. pokazuju samo biomase u vremenu t_0 kada su one kod bakterija imale najveću vrijednost, a kod heterotrofnih bičaša najmanju i rezultate u vremenu t_{66} kada većina heterotrofnih bičaša pokazuju pik u svom rastu, a u tom vremenu je i najmanja biomasa bakterijskih stanica. Sve biomase u određenom vremenu eksperimenta prikazane su Slikom 17. Najveća postignuta biomasa zabilježena je kod tretmana T6 na oba lokaliteta i iznosila je za Rimov 91,405 $\mu m^3 ml^{-1}$ te za Cep 61,336 $\mu m^3 ml^{-1}$, obje biomase statistički su se razlikovale od početne vrijednosti ($p<0,01$).

Tablica 9. Prikaz biomase heterotrofnih bičaša i bakterija u tretmanima sa lokaliteta Rimov u vremenu t_0 i t_{66}. Vrijednosti su srednje vrijednosti triplikata, a u zagradama je prikazana standardna devijacija.

RIMOV Vrijeme (h)	HNF-D5 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-D5 Fg C/stanica	HNF-KL $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-KL Fg C/stanica	HNF-T6 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-T6 Fg C/stanica	HNF-CON $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-CON Fg C/stanica
t_0	21,265 (±4,475)	39,250 (±0,490)	19,080 (±4,002)	66,4 (±5,091)	21,180 (±2,402)	53,9 (±2,545)	16,912 (±3,668)	12,85 (±0,490)
t_{66}	52,420 (±1,417)	26,3 (±0,565)	56,089 (±4,087)	53,8 (±2,404)	91,405 (±8,073)	44,9 (±0,989)	28,758 (±4,231)	14,1 (±0,989)

Tablica 10. Prikaz biomase heterotrofnih bičaša i bakterija u tretmanima sa lokaliteta Rimov u vremenu t_0 i t_{66}. Vrijednosti su srednje vrijednosti triplikata a u zagradama je prikazana standardna devijacija.

CEP Vrijeme (h)	HNF-D5 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-D5 Fg C/stanica	HNF-KL $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-KL Fg C/stanica	HNF-T6 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-T6 Fg C/stanica	HNF-CON $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-CON Fg C/stanica
t_0	17,700 (±5,047)	39,9 (±2,545)	19,799 (±4,002)	85,05 (±3,404)	17,533 (±3,628)	59,4 (±4,101)	12,938 (±1,061)	15,6 (±1,55)
t_{66}	50,035 (±3,385)	23,2 (±0,1)	39,286 (±1,162)	63,35 (±3,040)	61,336 (±2,703)	40,85 (±1,484)	7,592 (±0,608)	24,25 (±0,777)



Slika 17. Grafički prikaz odnosa biomasa heterotrofnih bičaša i bakterija u određenom periodu eksperimenta. U svakom tretmanu može se primjetiti kako vrijednosti biomase bakterija padaju dok vrijednosti biomasa heterotrofnih bičaša rastu. Najveći porast biomase zabilježen je u tretmanima T6. Na slici je povećanje biomase HNF prikazano crnom bojom a kontrola crvenom. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost triplikata, a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

4.2.2. II. Eksperiment (28. svibnja do 2. lipnja 2012.)

4.2.2.1. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova

Početna brojnost HNF u svim tretmanima iznosila je 2,635 x 10^3 ml^{-1} jer su u tretmane dodavani isti uzorci vode sa lokaliteta Rimov. Početni broj bakterija u tretmanima razlikova se jer su one dodane u tretmane u različitoj brojnosti kako bi kompenzirali njihov različit prosječan volumen stanica i doprinjeli približno istom početnom biovolumenu u svim tretmanima.

U tretmanu D5 gdje je početna brojnost bakterija iznosila 26,332 x 10^6 ml^{-1} u roku od 53 sata heterotrofni bičaši uspjeli su je smanjiti na više nego četiri puta manju od početne vrijednosti, koja je iznosila 5,743 x 10^6 ml^{-1} i statistički se razlikuje od početne vrijednosti ($p<0,01$). Nakon 66 sati brojnost bakterija i dalje opada i dostiže vrijednosti otprilike iste kao vrijednosti kontrole. Najniža brojnost zabilježena je zadnji dan ili nakon 114 sati eksperimenta i iznosi 1,333 x 10^6 ml^{-1} te se statistički značajno razlikuje od početne vrijednosti ($p<0,001$). Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 66 sati i iznosila je 55,567 x 10^3 ml^{-1} i statistički se znatno razlikovala od one na početku eksperimenta ($p<0,01$).

U tretmanu KL početna brojnost bakterija iznosila je 6,754 x 10^6 ml^{-1}. Tijekom slijedećih 53 sata eksperimenta brojnost bakterija se lagano povećavala (statistički nije značajno $p>0,05$) da bi nakon 66 sati počela padati te nakon 90 sati dosegla vrijednost koja je bila značajno manja od početne vrijednosti i iznosila je 0,661 x 10^6 ml^{-1}, što je slično i vrijednostima zabilježenim u kontrolnom uzorku i statistički se značajno razlikuje od početne vrijednosti ($p<0,001$). Najveću brojnost heterotrofni bičaši postižu nakon 66 sati, 28,90 x 10^3 ml^{-1}, što odgovara početnoj fazi pada brojnosti bakterija i statistički se značajno razlikuje od početne brojnosti ($p<0,01$).

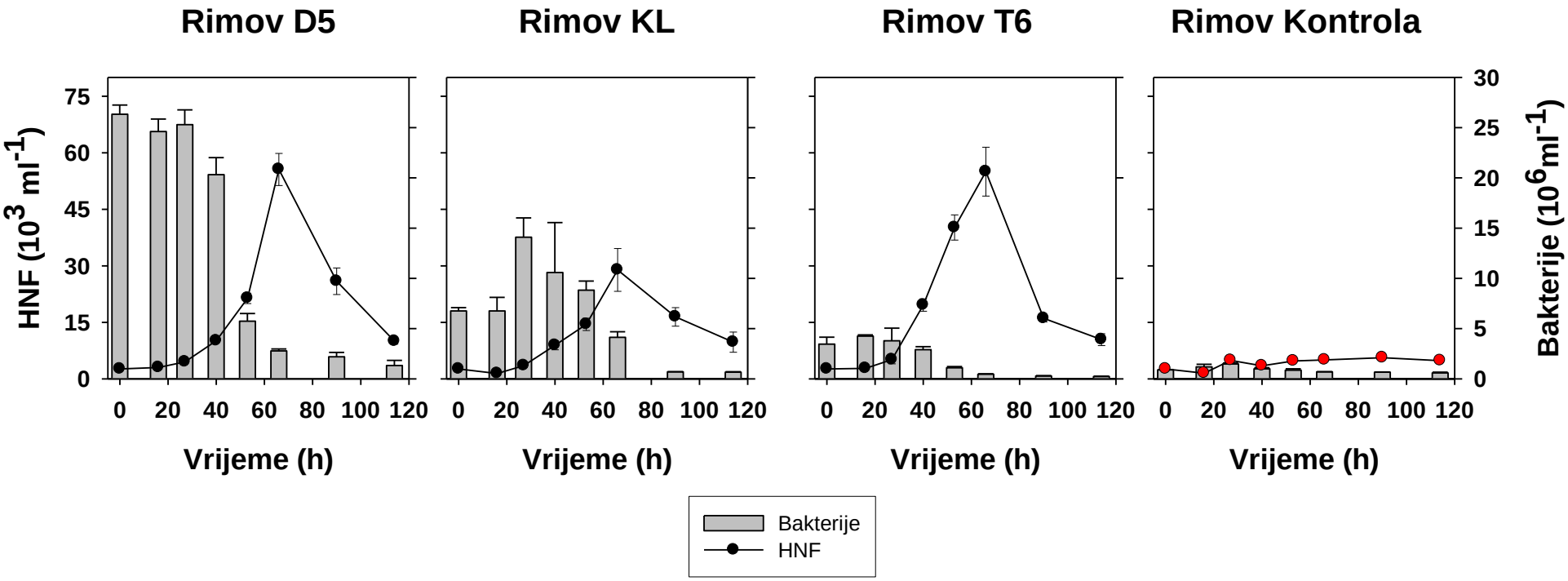
U tretmanu T6 početna brojnost bakterija iznosila je 9,231 x 10^6 ml^{-1}. Tijekom slijedećih 40 sati eksperimenta bakterije pokazuju lagan porast u brojnosti ($p>0,05$, statistički nije značajno) te nakon 53 sata počinju opadati i dostižu brojnost od 2,925 x 10^6 ml^{-1} što je troduplo manje od početne vrijednosti i slično vrijednostima bakterija u kontrolnim uzorcima te se statistički znatno razlikuje od početne vrijednosti ($p<0,01$). Brojnost bakterija smanjuje

se do kraja eksperimenta te je najmanja zabilježena brojnost iznosila 0, 620 x 10^6 ml^{-1} što je statistički značajno manje od početne vrijednosti. Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 54,98 x 10^3 ml^{-1}, što odgovara početku pada brojnosti bakterija i statistički se razlikuje od početne vrijednosti ($p<0,01$).
Svi navedeni rezultati prikazani su Tablicom 11. i Slikom 18.

Tablica 11. Brojnost heterotrofnih bičaša i bakterija u određenim tretmanima (D5, KL, T6 i KONTROLA) u određenom vremenu i danu eksperimenta. Vrijednosti koje su prikazane u tablici su srednje vrijednosti triplikata, u zagradama se nalazi standardna devijacija. Sivom

bojom označene su najveće zabilježene brojnosti heterotrofnih bičaša i najmanje zabilježene brojnosti bakterija kod sva tri soja.

Datumi i sat uzimanja poduzoraka (RIMOV)	**Vrijeme (h)**	**HNF-D5 $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-D5 $10^6 ml^{-1}$**	**HNF-KL $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-KL $10^6 ml^{-1}$**	**HNF-T6 $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-T6 $10^6 ml^{-1}$**	**HNF-CON $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-CON $10^6 ml^{-1}$**
28.5., 15.00	t_0	2,635 (±0,23)	26,332 (±0,920)	2,640 (±0,23)	6,754 (±0,33)	2,635 (±0,22)	9,231 (±1,84)	2,64 (±0,22)	2,377 (±0,07)
29.5., 7.00	t_{16}	3,024 (±0,22)	24,611 (±1,236)	1,430 (±0,13)	6,754 (±1,34)	2,788 (±0,26)	11,336 (±0,34)	1,51 (±0,12)	3,178 8 (±0,69)
29.5., 18.00	t_{27}	4,483 (±0,28)	25,293 (±1,475)	3,50 (±0,46)	14,100 (±1,91)	5,09 (±1,10)	10,112 (±3,33)	4,89 (±0,28)	3,927 (±0,28)
30.5., 7.00	t_{40}	10,106 (±0,12)	20,313 (±1,692)	8,92 (±1,22)	10,577 (±4,97)	19,58 (±1,64)	7,732 (±0,79)	3,46 (±0,02)	2,654 (±0,32)
30.5., 18.00	t_{53}	21,370 (±1,38)	5,743 (±0,759)	14,46 (±1,63)	8,831 (±0,902)	40,15 (±3,33)	2,925 (±0,34)	4,73 (±0,26)	2,305 (±0,35)
31.5.	t_{66}	55,567 (±4,25)	2,785 (±0,189)	28,90 (±5,69)	4,126 (±0,56)	54,98 (±6,48)	1,226 (±0,12)	5,04 (±0,39)	1,851 (±0,03)
1.6.	t_{90}	25,893 (±3,51)	2,190 (±0,435)	16,45 (±2,46)	0,695 (±0,01)	16,08 (±0,99)	0,747 (±0,11)	5,634 (±0,29)	1,775 (±0,02)
2.6.	t_{114}	9,984 (±0,75)	1,333 (±0,504)	9,75 (±2,67)	0,661 (±0,05)	10,40 (±1,59)	0,620 (±0,07)	4,82 (±0,46)	1,575 (±0,21)



Slika 18. Grafički prikaz pada brojnosti bakterija i porasta brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL, T6 i kontroli. Iz navedenih rezultata može se vidjet kako je brojnost bila najveća u tretmanu D5, nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 55,567 x 10^3 ml^{-1} zatim u tretmanu T6 gdje je brojnost nakon istog vremena bila 54,980 x 10^3 ml^{-1}. U tretmanu KL brojnost se pokazala najvećom također nakon 66 sati i iznosila je 28,90 x 10^3. U kontrolnom uzorku, koji je na slici prikazan crvenom bojom, brojnost HNF se nije značajno mijenjala tijekom cijeloga eksperimenta ($p>0,05$,One way ANOVA). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

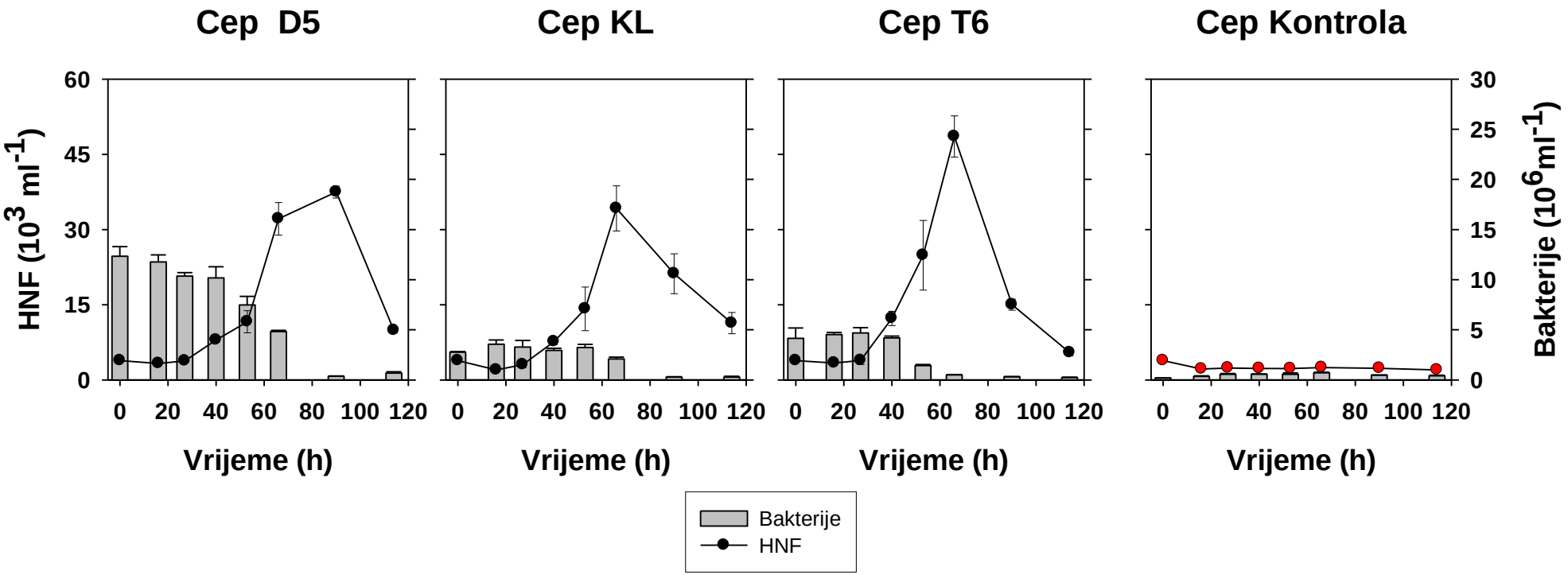
4.2.2.2. Pad brojnosti bakterija i porast brojnosti HNF u tretmanima iz Cepa

Početna brojnost HNF u svim tretmanima iznosila je 3,855 x 10^3 ml^{-1} jer su u tretmane dodavani isti uzorci vode sa lokaliteta Cep. Početni broj bakterija u tretmanima razlikova se kako je navedeno u prethodnom poglavlju.

U tretmanu D5 početna brojnost bakterija iznosila je 24,687 x 10^6 ml^{-1}. Prvih 53 sata eksperimenta brojnost se ne mijenja značajno ($p>0,05$), da bi nakon 66 sati pala na duplo manju vrijednost od početne te je nakon 90 sati eksperimenta iznosila 0,737 x 10^6 ml^{-1} što je značajno manje od početne brojnosti ($p<0,001$) i slično je vrijednostima koje su zabilježene u kontrolnom uzorku. Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 90 sati eksperimenta i iznosila je 37,48 x 10^3 ml^{-1} što odgovara i najnižoj brojnosti bakterija u to vrijeme i statistički se razlikuje od početne brojnosti ($p<0,01$).
U tretmanu KL početna brojnost bakterija bila je 5,542 x10^6 ml^{-1}. Prvih 66 sata eksperimenta nije zabilježena velika promjena brojnosti bakterija da bi nakon 90 sati brojnost značajno pala ($p<0,001$) i iznosila 0,570 x 10^6 ml^{-1} što je bilo slično brojnosti zabilježenoj u kontrolnim uzorcima. Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 34,21 x 10^3 ml^{-1} te se statistički značajno razlikovala od kontrole ($p<0,01$).
U tretmanu T6 početna brojnost bakterija iznosila je 8,282 x 10^6 ml^{-1}. Prvih 40 sati eksperimenta nije zabilježena veća promjena brojnosti bakterija da bi nakon 53 sata brojnost počela padati i iznosila je 2,858 x 10^6 ml^{-1}. Nakon 114 sati eksperimenta zabilježena je najniža brojnost ($p<0,001$) i iznosila je 0,453 x 10^6 ml^{-1} što odgovara vrijednostima u kontrolnim uzorcima. Najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena je nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 48,567 x 10^3 ml^{-1} i bila je značajno različita u odnosu na početnu ($p<0,01$).
Svi navedeni rezultati prikazani su Tablicom 12. i Slikom 19.

Tablica 12. Brojnost heterotrofnih bičaša i bakterija u određenim tretmanima (D5, KL, T6 i KONTROLA) u određenom vremenu i danu eksperimenta. Vrijednosti koje su prikazane u tablici su srednje vrijednosti triplikata, u zagradama se nalazi standardna devijacija. Sivom bojom označene su najviše zabilježene vrijednosti heterotrofnih bičaša i najniže zabilježene vrijednosti bakterija kod sva tri tretmana.

Datumi i sat uzimanja poduzoraka (CEP)	**Vrijeme (h)**	**HNF-D5 $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-D5 $10^6 ml^{-1}$**	**HNF-KL $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-KL $10^6 ml^{-1}$**	**HNF-T6 $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-T6 $10^6 ml^{-1}$**	**HNF-CON $10^3 ml^{-1}$**	**BAKT-CON $10^6 ml^{-1}$**
28.5., 15.00	t_0	3,855 (±0,09)	24,687 (±1,91)	3,855 (±0,09)	5,542 (±0,12)	3,855 (±0,09)	8,282 (±2,09)	3,855 (±0,09)	0,387 (±0,009)
29.5., 7.00	t_{16}	3,30 (±0,15)	23,541 (±1,40)	1,99 (±0,20)	7,127 (±0,84)	3,386 (±0,27)	9,058 (±0,420)	2,165 (±0,14)	0,690 (±0,127)
29.5., 18.00	t_{27}	3,79 (±0,05)	20,717 (±0,69)	3,05 (±0,60)	6,554 (±1,31)	3,889 (±0,82)	9,376 (±1,03)	2,40 (±0,339	1,124 (±0,155)
30.5., 7.00	t_{40}	7,97 (±0,39)	20,347 (±2,23)	7,64 (±0,57)	5,907 (±0,40)	12,274 (±1,42)	8,381 (±0,37)	2,29 (±0,23)	1,152 (±0,043)
30.5., 18.00	t_{53}	11,60 (±2,20)	14,965 (±1,70)	14,19 (±4,34)	6,467 (±0,63)	24,86 (±6,94)	2,858 (±0,20)	2,26 (±0,09)	1,136 (±0,244)
31.5.	t_{66}	32,14 (±3,25)	9,631 (±0,26)	34,21 (±4,49)	4,174 (±0,35)	48,57 (±4,11)	1,001 (±0,07)	2,47 (±0,17)	1,423 (±0,13)
1.6.	t_{90}	37,48 (±1,18)	0,737 (±0,048)	21,18 (±3,97)	0,570 (±0,08)	15,01 (±1,12)	0,632 (±0,02)	2,32 (±0,11)	0,963 (±0,018)
2.6.	t_{114}	9,89 (±0,47)	1,374 (±0,26)	11,34 (±2,11)	0,541 (±0,19)	5,45 (±0,64)	0,453 (±0,10)	1,99 (±0,06)	0,831 (±0,106)



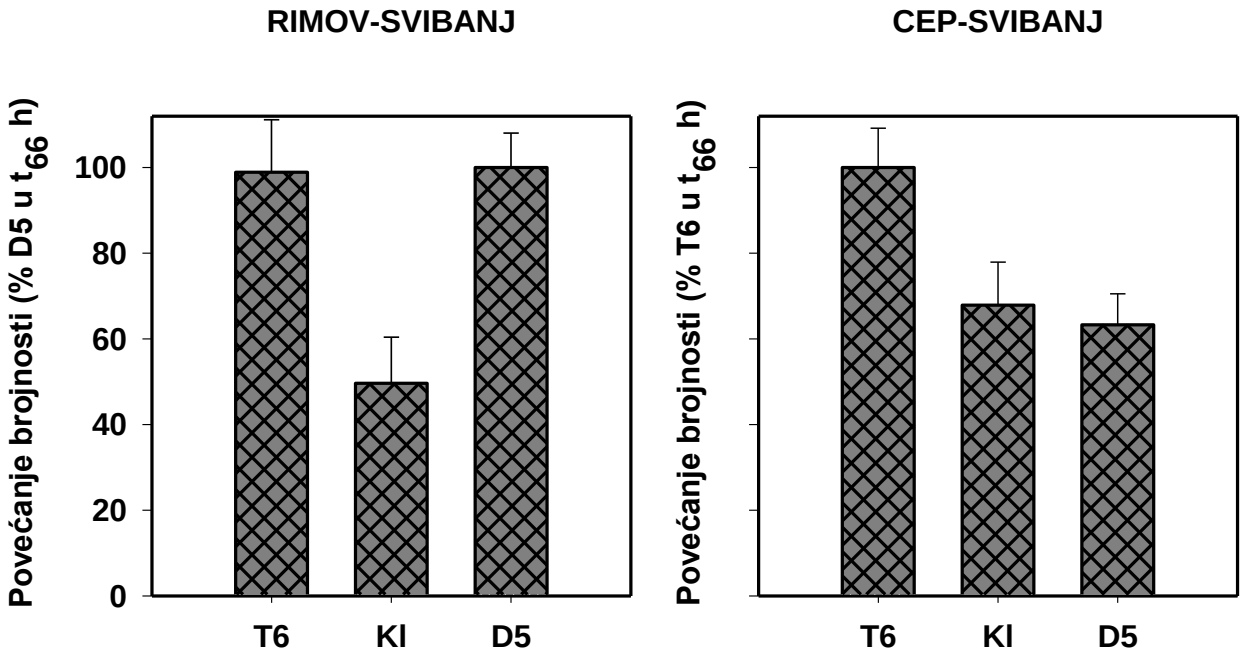
Slika 19. Grafički prikaz pada brojnosti bakterija i porasta brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL, T6 i kontroli. Iz navedenih rezultata može se vidjet kako je brojnost bila najveća u tretmanu T6, nakon 66 sati eksperimenta i iznosila je 48,567 x 10^3 ml^{-1} . U tretmanima gdje se nalazio soj D5 najveća brojnost zabilježena je nakon 90 sati i iznosila je 37, 48 x 10^3 ml^{-1} a najveća brojnost u tretmanu KL zabilježena je nakon 66 sati i iznosila je 34,21 x 10^3 ml^{-1}. U kontrolnom uzorku, koji je na slici prikazan crvenom bojom, brojnost HNF se nije značajno mjenjala tijekom cijeloga eksperimenta (One way ANOVA, $p>0,05$). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

4.2.2.3. Prirast brojnosti heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa

Ako pogledamo podatke o brojnosti heterotrofnih bičaša (Tablica 13. i Tablica 14.) možemo zaključiti kako je najveća brojnost heterotrofnih bičaša zabilježena u tretmanima sa lokaliteta Rimov, kod soja D5 i to nakon 66 sati eksperimenta ili u vremenu t_{66} i iznosila je 55,567 x 10^3 ml^{-1}. U tretmanima sa lokaliteta Cep najveća brojnost zabilježena je kod soja T6, također nakon 66 sati eksperimenta ili u vremenu t_{66} i iznosila je 48,567 x 10^3 ml^{-1}. Prema navedenim vrijednostima izračunat je postotak prinosa brojnosti heterotrofnih bičaša prikazan Slikom 18. Soj D5, na lokalitetu Rimov, u vremenu t_{66} pokazuje 100%-tni prirast brojnosti, a u odnosu na njega soj T6 pokazuje prirast od 94% a soj KL 47%. Soj T6, na lokalitetu Cep, u vremenu t_{66} pokazuje 100%-tni prirast brojnosti, a u odnosu na njega soj D5 pokazuje prirast od 67% a soj KL 63%. Univarijantna analiza varijance (One-way ANOVA, popraćena Tukey testom) pokazala je kako je brojnost heterotrofnih bičaša, u vremenu t_{66}, između tretmana gdje su se nalazili testirani sojevi statistički značajno različita ($p<0,001$). Rezultati Tukey testa prikazani su Tablicom 13.

Tablica 13. Rezultati Tukey testa, crna boja pokazuje kako razlike u brojnosti između tretmana, u vremenu t_{66}, nisu statistički značane a siva da postoje statistički značajne razlike (q=6,10, HSD=12,04).

USPOREĐIVANI TRETMANI	D5-Rim	KL-Rim	T6-Rim	D5-Cep	KL-Cep
D5-Rim					
KL-Rim					
T6-Rim					
D5-Cep					
KL-Cep					
T6-Cep					



Slika 20. Grafički prikaz povećanja brojnosti heterotrofnih bičaša koji su rasli na različitim sojevima. Postotak je izražen s obzirom na brojnosti heterotrofnih bičaša. Kod tretmana iz Rimova brojnost je izražena s obzirom na postotak brojnosti soja D5, a kod tretmana iz Cepa to je s obzirom na postotak brojnosti soja T6, gdje je, u oba tretmana zabilježena najveća brojnost tijekom eksperimenta, u vremenu t_{66}. Prikazane vrijednosti su srednja vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

4.2.2.4. Specifična stopa rasta i duljina lag faze heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa

Prema dobivenim rezultatima najduža lag-faza zabilježena je, osim u kontrolama, kod tretmana KL iz Cepa i iznosila je 29,7 sati. Tretmani sa lokaliteta Rimov pokazuju kraće lag-faze u odnosu na one sa lokaliteta Cep. Najkraća lag-faza zabilježena, je kod tretmana iz Rimova u prisustvu soja D5 i znosila je 16,9 sati a kod Cepa najkraća lag-faza zabilježena je u prisustvu soja T6 i iznosila je 25,9 sati.

Specifična stopa rasta, osim u kontrolama, bila je najmanja u D5 tretmanu sa lokaliteta Cep. Najveća vrijednost stope rasta kod tretmana sa oba lokaliteta bila je u prisustvu soja T6 i iznosila je 2,091 dan^{-1}, kod Rimova i 1,701 dan^{-1} kod Cepa.

Interval rasta za sve tretmane iz Rimova, pokazao se dosta različit između sojeva i svi rezultati prikazani su u Tablici 13. Najduži interval rasta imao je soj D5, od 37-63 sata. Intervala rasta za sve tretmane iz Cepa, osim za T6, bio je od 40-66 sati, dok je za T6 iznosio od 27-53 sata.

Univarijantna analiza varijance (One-way ANOVA), popraćena Tukey testom, pokazala je da su razlike između duljina lag-faza heterotrofnih bičaša u ponuđenim sojevima statistički vrlo značajne ($p<0,001$). Rezultati Tukey testa prikazani su Tablicom 17.

Univarijantna analiza varijance (One-way ANOVA), pokazala je da su razlike između specifične stope rasta heterotrofnih bičaša u ponuđenim sojevima statistički značajne ($P<0,01$).

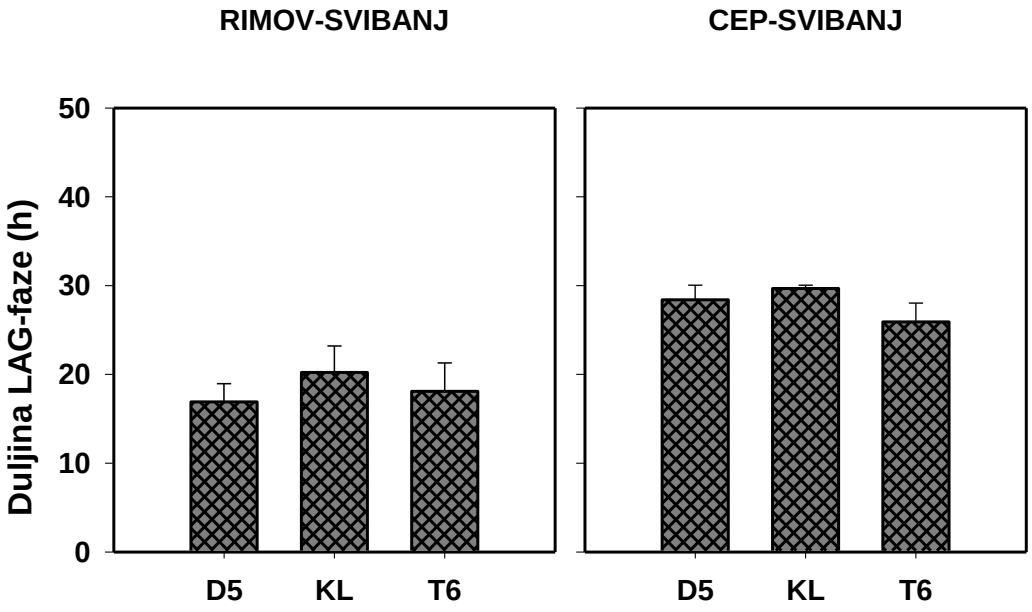
Svi navedeni rezulati prikazani su Tablicom 18. i Slikom 11. i 22.

Tablica 17. Rezultati Tukey testa, crna boja pokazuje kako razlike u dužini lag faze između testiranih tretmana nisu statistički značajne dok siva pokazuje statističku značajnost ($q=6,10$ $HSD=5,676$). Prema navedenim rezultatima možemo zaključiti kako se u većini slučajeva, lag-faze unutar jednog lokaliteta statistički ne razlikuju dok se statistički razlikuju između lokaliteta.

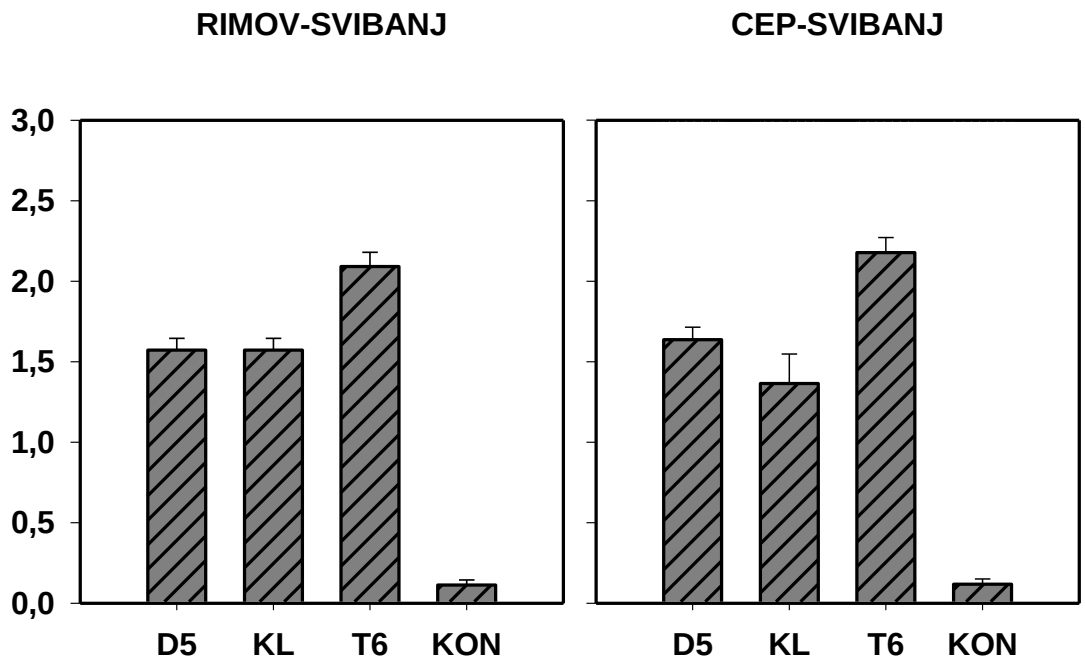
USPOREĐIVANI TRETMANI	Rim-D5	Rim-KL	Rim-T6	Cep-D5	Cep-KL
Rim-D5					
Rim-KL					
Rim-T6					
Cep-D5					
Cep-KL					
Cep-T6					

Tablica 18. U tablici su prikazane vrijednosti specifičnog faktora rasta, lag-faze i intervala rasta navedenih tretmana iz Rimova i Cepa. Prikazane vrijednosti srednja su vrijednost triplikata.

Sojevi	Interval (h)	μ (h^{-1})	μ (dan^{-1})	LAG (h)
D5-RIM	37-63	0,065	1,572	16,9
KL-RIM	27-53	0,055	1,572	20,2
T6-RIM	16-40	0,087	2,091	18,1
KON-RIM	53-90	0,005	0,114	78,3
D5-CEP	40-66	0,054	1,285	28,4
KL-CEP	40-66	0,060	1,444	29,7
T6-CEP	27-53	0,071	1,701	25,9
KON-CEP	40-66	0,004	0,108	166,8



Slika 21. Grafički prikaz duljina lag-faza heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL i T6. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.



Slika 22. Grafički prikaz specifične stope rasta heterotrofnih bičaša u tretmanima D5, KL, T6 i KON u ovisnosti o vremenu. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost triplikata a zastavice standardnu devijaciju.

4.2.2.5. Promjene u biomasi bakterija i heterotrofnih bičaša u tretmanima iz Rimova i Cepa

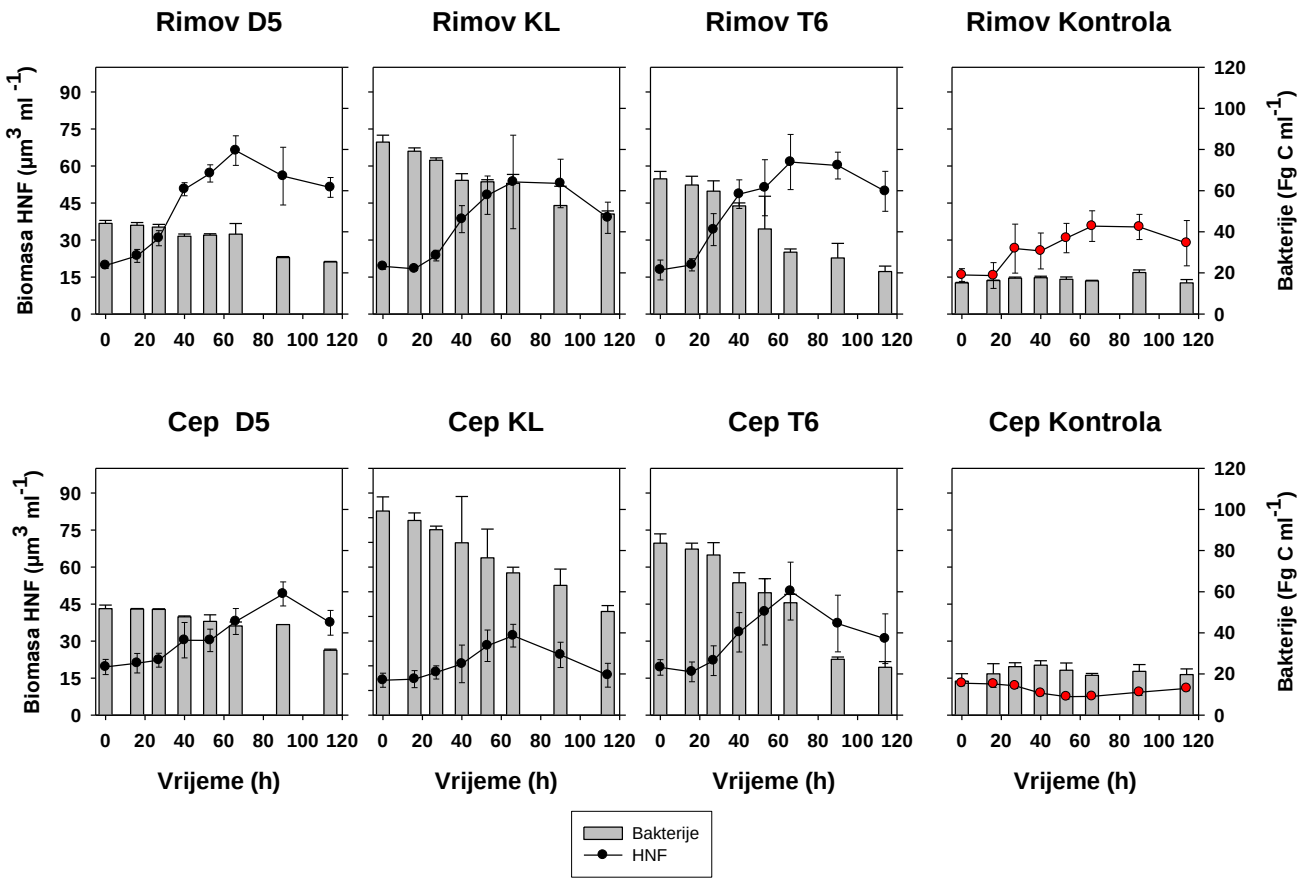
Rezulati biomase, kao i rezultati brojnosti pokazuju smanjenje biomase bakterija i povećanje biomase heterotrofnih bičaša. Razultati prikazani Tablicom 16. i Tablicom 17. pokazuju samo biomase u vremenu t_0 kada su one kod bakterija imale najveću vrijednost a kod heterotrofnih bičaša najmanju i rezultate u vremenu t_{66} kada većina heterotrofnih bičaša pokazuju pik u svom rastu a u tom vremenu je i najmanja biomasa bakterijskih stanica. Sve biomase u određenom vremenu eksperimenta prikazane su Slikom 23. Najveća postignuta biomasa zabilježena u tretmanima sa lokaliteta Rimov je kod soja D5 i iznosi 62,211 $\mu m^3 ml^{-1}$ a kod lokaliteta Cep za soj T6 i iznosila je 50,243 $\mu m^3 ml^{-1}$.

Tablica 16. Prikaza bomasa heterotrofnih bičaša i bakterija u tretmanima sa lokaliteta Rimov u vremenu t_0 i t_{66}. Vrijednosti su srednje vrijednosti triplikata a u zagradam je prikazana standardna devijacija.

RIMOV Vrijeme (h)	HNF-D5 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-D5 Fg C/stanica	HNF-KL $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-KL Fg C/stanica	HNF-T6 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-T6 Fg C/stanica	HNF-CON $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-CON Fg C/stanica
t_0	19,695 (±1,191)	44,1 (±1,414)	19,301 (±1,196)	83,6 (±3,394)	17,857 (±4,028)	65,75 (±3,606)	15,816 (±2,582)	15,15 (±0,212)
t_{66}	62,211 (±5,989)	38,85 (±5,161)	53,543 (±18,951)	63,55 (±4,313)	61,539 (±11,158)	30,1 (±0,155)	35,630 (±6,193)	16,1 (±0,282)

Tablica 17. Prikaz bomasa heterotrofnih bičaša i bakterija u tretmanima sa lokaliteta Cep u vremenu t_0 i t_{66}. Vrijednosti su srednje vrijednosti triplikata a u zagrada je prikazana standardna devijacija

CEP Vrijeme (h)	HNF-D5 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-D5 Fg C/stanica	HNF-KL $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-KL Fg C/stanica	HNF-T6 $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-T6 Fg C/stanica	HNF-CON $\mu m^3 ml^{-1}$	BAKT-CON Fg C/stanica
t_0	9,514 (±3,007)	51,75 (±1,767)	21,186 (±4,240)	99,2 (±6,929)	19,343 (±3,146)	83,6 (±4,525)	19,432 (±4,610)	16,55 (±3,606)
t_{66}	37,934 (±5,243)	43,35 (±1,909)	48,268 (±6,932)	69,15 (±2,757)	50,243 (±13,427)	54,65 (±4,030)	18,364 (±0,592)	19,35 (±0,919)



Slika 23. Grafički prikaza odnosa biomasa heterotrofnih bičaša i bakterija u određenom periodu eksperimenta. U svakom tretmanu može se primjetiti kako vrijednosti biomase bakterija padaju dok vrijednosti biomasa heterotrofnih bičaša rastu. Najveći porast biomase zabilježen je u tretmanima D5 sa lokaliteta Rimov i T6 sa lokaliteta Cep. Na slici je porast biomase HNF prikazan crno a kontrola crveno. Prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost triplikata a zastavice predstavljaju standardnu devijaciju.

4.3. Raspodjela veličina heterotrofnih bičaša

Rezultati o raspodjeli veličina pokazuju kako na početku eksperimenta dominiraju heterotrofni bičaši manjeg prosječnog volumena. Sredinom eksperimenta kad su heterotrofni bičaši u gotovo svim tretmanima dosegli najveću brojnost, raspodjela veličina je različita ali se pomiče prema većim dimenzijama. Pred kraj eksperimenta zabilježeni su heterotrofni bičaši najvećeg volumena. Prikazani su rezultati kontrole u vremenu t_0 jer to predstavlja vrijeme početka eksperimenta kad bi raspodjela veličina heterotrofnih bičaša trebala biti jednaka kod sva tri tretmana. Nadalje, prikazane su dimenzije u vremenu t_{66} kada su u većini tretmana heterotrofni bičaši dosegli svoju najveću brojnost, ovisno o tretmanu u kojem se nalaze i rezultati dimenzija zadnjeg dana eksperimenta, t_{114}, kada dominiraju heterotrofni bičaši najvećeg zabilježenog volumena.

4.3.1. Raspodjela veličina heterotrofnih bičaša u vremenu t_0

Vrijeme t_0 predstavlja početak eksperimenta, kad su zajednice heterotrofnih bičaša bile jednake u svim uzorcima i još nisu pod utjecajem bakterijskog plijena.

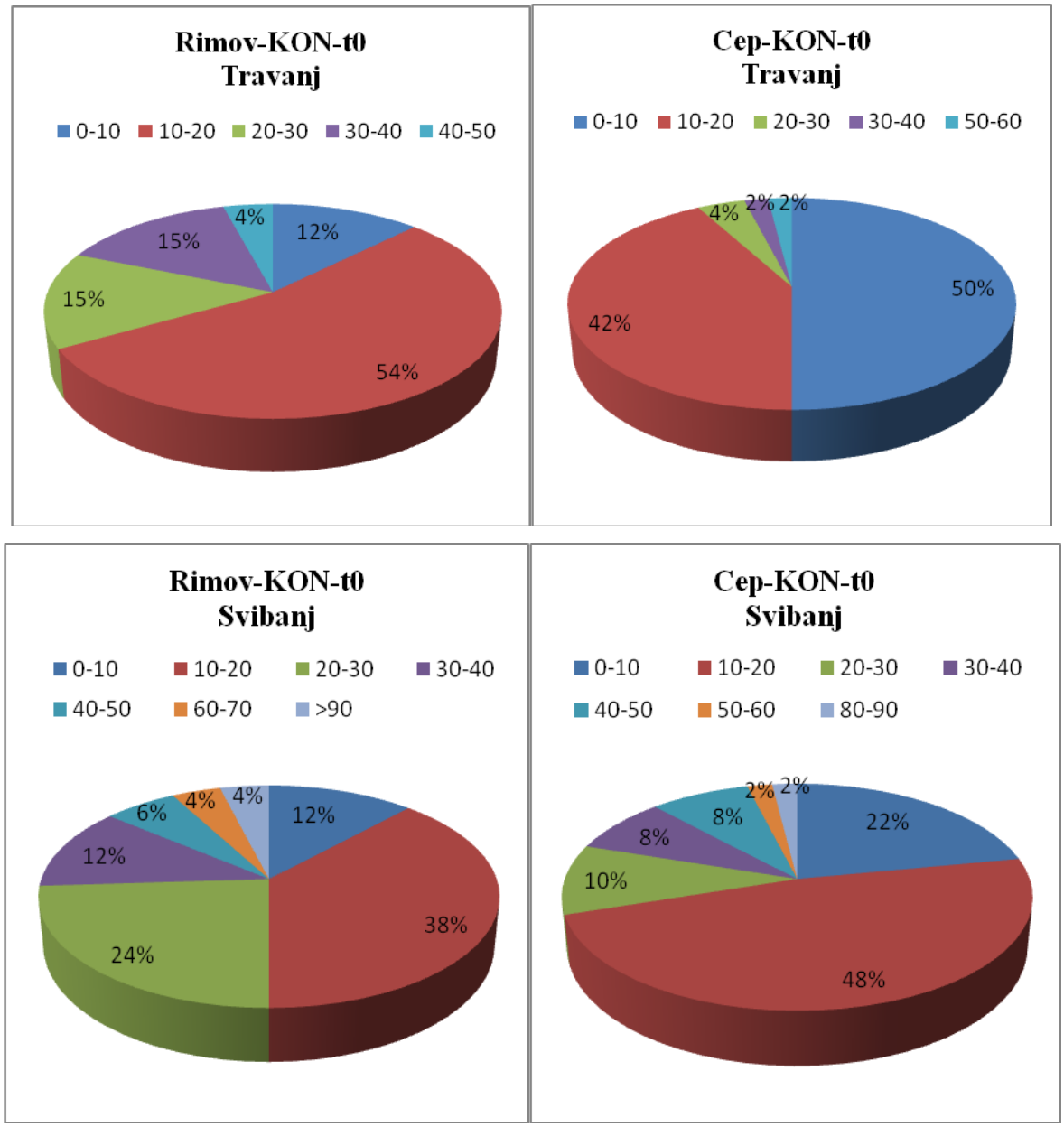
4.3.1.1. Travanj

Kontrolni uzorci sa lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (50%), zatim od 20-30 μm^3 (15%). Kontrolni uzorci sa lokaliteta Cep pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od 0-10 μm^3 (50%), zatim od 10-20 μm^3 (42%) (Slika 24).

4.3.1.2. Svibanj

Kontrolni uzorci sa lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša prosječnog volumena od 10-20 μm^3 (38%), zatim 20-30 μm^3 (24%). Kontrolni uzorci sa lokaliteta Cep pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša prosječnog volumena od 10-20 μm^3 (48%), zatim 0-

10 μm^3 (22%). Zajednice heterotrofnih bičaša u svibnju pokazuju veći raspon dimenzija, odnosno volumena (Slika 24).



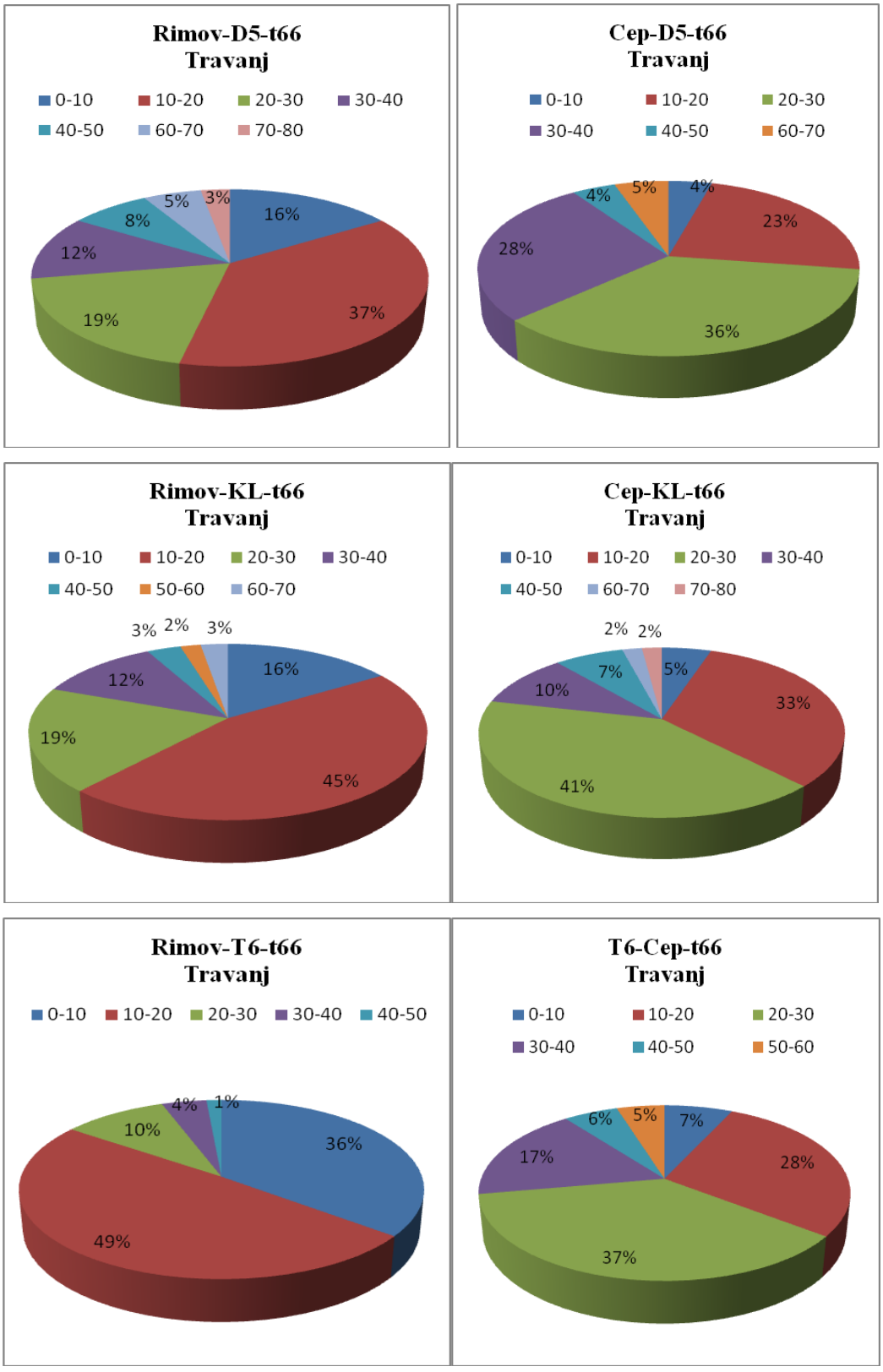
Slika 24. Grafički prikaz raspodjele volumena heterotrofnih bičaša u kontrolnom uzorku, u vremenu t_0 u travnju i svibnju. Vrijednosti prikazane grafom predstavljaju zapravo broj heterotrofnih bičaša određenog volumena koji je izmjeren u vremenu t_0 u kontrolnom uzorku, pretvoren u postotke. Raspon veličina u grafu označen je različitim bojama i predstavlja volumen heterotrofnih bičaša u μm^3.

4.3.2. Raspodjela heterotrofnih bičaša u vremenu t_{66}

Izabrano je vrijeme t_{66} zato jer je u tome vremenu, tijekom eksperimenata većinom zabilježen maksimum rasta zajednica heterotrofnih bičaša.

4.3.2.1. Travanj

Uzorci sa sojem D5, sa lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (37%), zatim od 20-30 μm^3 (19%) što nije mnogo drugačije nego u kontroli ali je također zabilježeno i povećanje broja heterotrofnih bičaša sa većim prosječnim volumenom, kao npr. od 60-80 μm^3, koji nisu zabilježeni u kontroli .
Uzorci sa sojem D5, sa lokaliteta Cep pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od 20-30 μm^3 (36%), zatim od 30-40 μm^3 (38%). Ovdje se primjećuje pomak volumena prema većem prosječnom volumenu u odnosu na kontrolu i smanjenje broja heterotrofnih bičaša prosječnog volumena 56-60 μm^3 (u kontroli je taj postoak bio 50% a sada je 5%)
Uzorci sa sojem KL, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (45%), zatim od 20-30 μm^3 (19%) što također nije mnogo drugačije nego u kontrolnom uzorku ali i ovdje je zabilježeno povećanje broja heterotrofnih bičaša većeg prosječnog volumena, koji nisu bili prisutni u kontroli (npr. 60-70 μm^3). Uzorci sa sojem KL, s lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 20-30 μm^3 (41%), zatim od 10-20 μm^3 (33%).
Uzorci sa sojem T6, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (49%), zatim od 40-50 μm^3 (36%). Uzorci sa sojem T6, sa lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od 20-30 μm^3 (37%), zatim od 10-20 μm^3 (28%) i 30-40 μm^3 (17%).
U sva tri tretmana primjećen je pomak prema heterotrofnim bičašima većeg prosječnog volumena ali i dominacija heterotrofnih bičaša prosječnog volumena od 10-30 μm^3.
Navedeni rezultati prikazani su slikom 25.

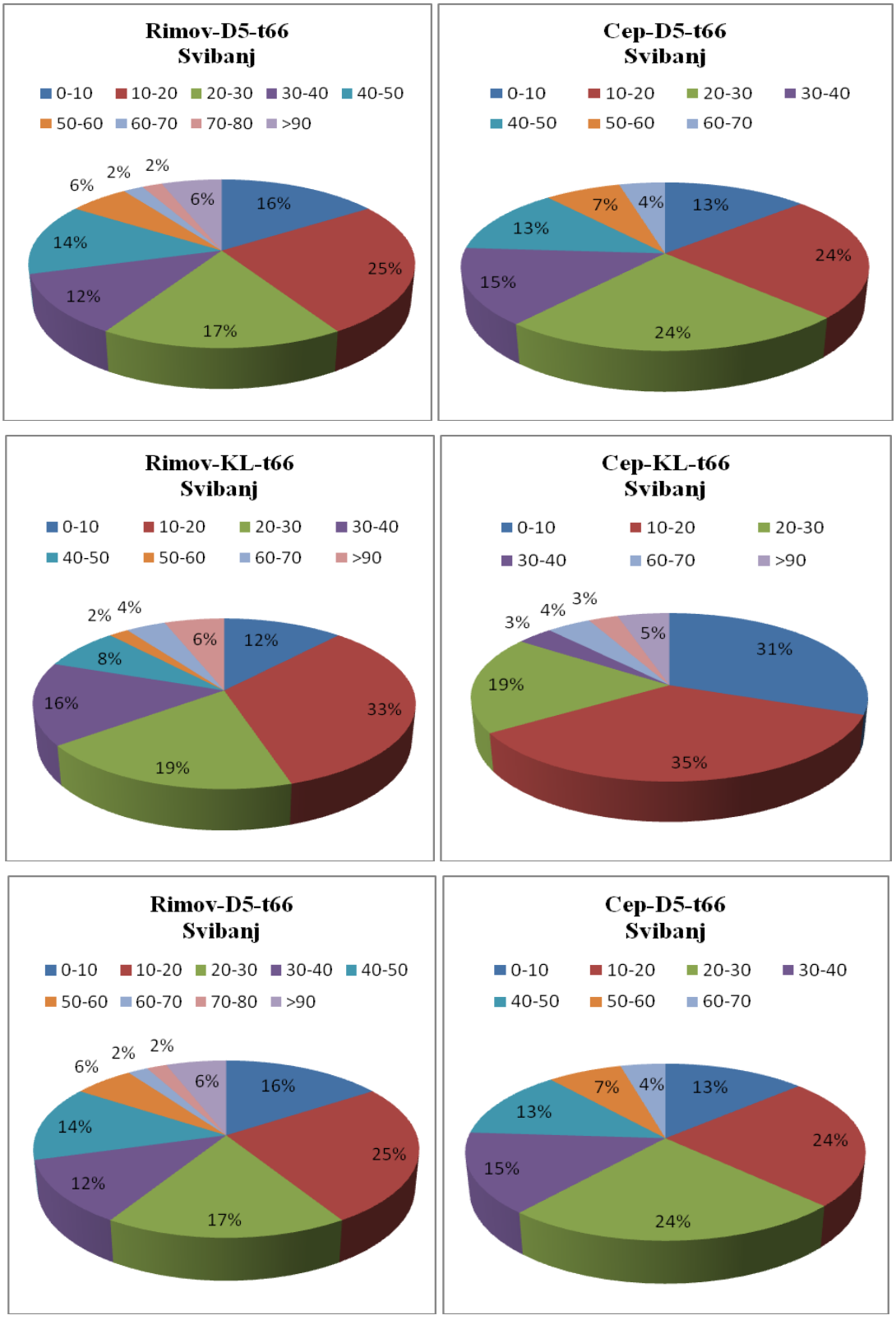


Slika 25. Grafički prikaz raspodjele volumena heterotrofnih bičaša u uzorcima gdje su se nalazili sojevi D5, KL i T6, u vremenu t_{66} u travnju i svibnju. Vrijednosti prikazane grafom predstavljaju zapravo broj heterotrofnih bičaša određenog volumena koji je izmjeren u

vremenu t_{66} u uzorcima gdje su se nalazili testirani sojevi, pretvoren u postotke. Raspon veličina u grafu označen je različitim bojama i predstavlja volumen heterotrofnih bičaša u μm^3.

4.3.2.1. Svibanj

Uzorci sa sojem D5, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (25%), zatim od 20-30 μm^3 (17%). Uzorci sa sojem D5, s lokaliteta Cep pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (24%), zatim od 20-30 μm^3 (24%).
Uzorci sa sojem KL, sa lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (33%), zatim od 20-30 μm^3 (19%). Uzorci sa sojem KL, sa lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (35%), zatim od 0-10 μm^3 (31%).
Uzorci sa sojem T6, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 10-20 μm^3 (24%), zatim od 20-30 μm^3 (24%). Uzorci sa sojem T6, s lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 0-10 μm^3 (24%), zatim od 20-30 μm^3 (21%). Zabilježena je pojava heterotrofnih bičaša većeg prosječnog volumen nego je to bilo u kontroli, a to je >od 90 μm^3.
U sva tri tretmana primjećen je pomak prema heterotrofnim bičašima većeg prosječnog volumena ali i dominacija heterotrofnih bičaša prosječnog volumena od 10-30 μm^3.
Navedeni rezultati prikazani su slikom 26.



Slika 26. Grafički prikaz raspodjele volumena heterotrofnih bičaša u uzorcima gdje su se nalazili sojevi D5, KL i T6, u vremenu t_{66} u travnju i svibnju. Vrijednosti prikazane grafom predstavljaju zapravo broj heterotrofnih bičaša određenog volumena koji je izmjeren u

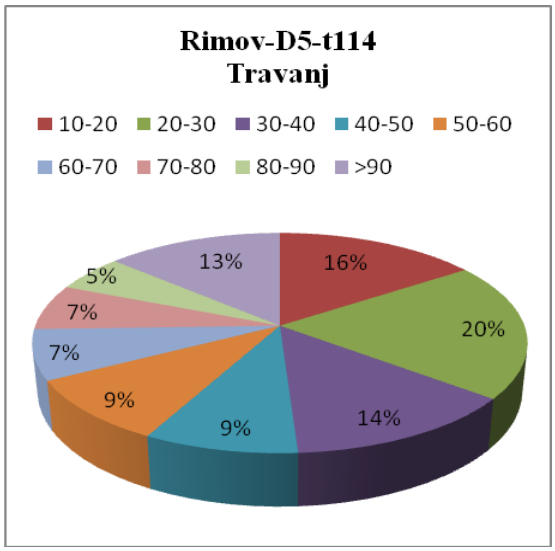
vremenu t_{66} u uzorcima gdje su se nalazili testirani sojevi, pretvoren u postotke. Raspon veličina u grafu označen je različitim bojama i predstavlja volumen heterotrofnih bičaša u μm^3.

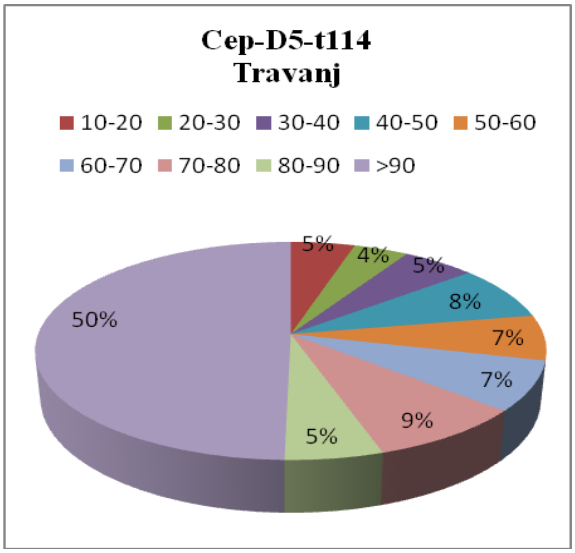
4.3.3. Raspodjela heterotrofnih bičaša u vremenu t_{114}

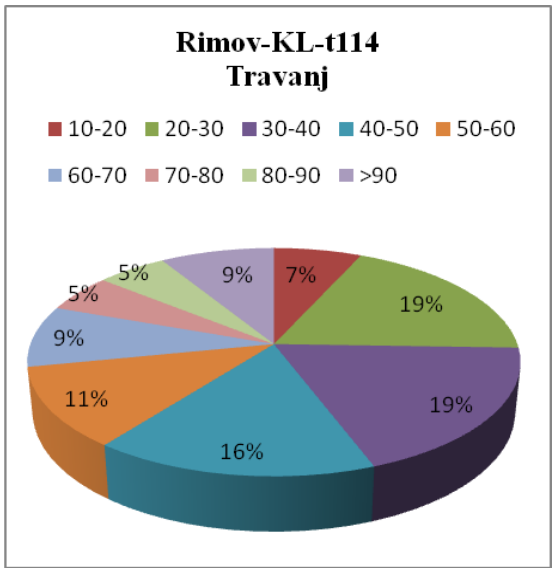
Zadnji dan eksperimenta (t_{114}) izabran je zato jer je primjećeno da se kod tretmana u kojima su se nalazili određeni sojevi počinju pojavljivati heterotrofni bičaši mnogo većih dimenzija nego je to bilo na početku eksperimenta.

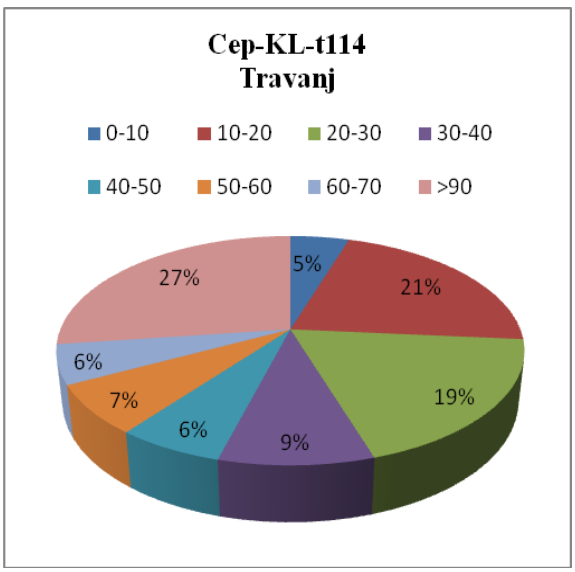
4.3.3.1. Travanj

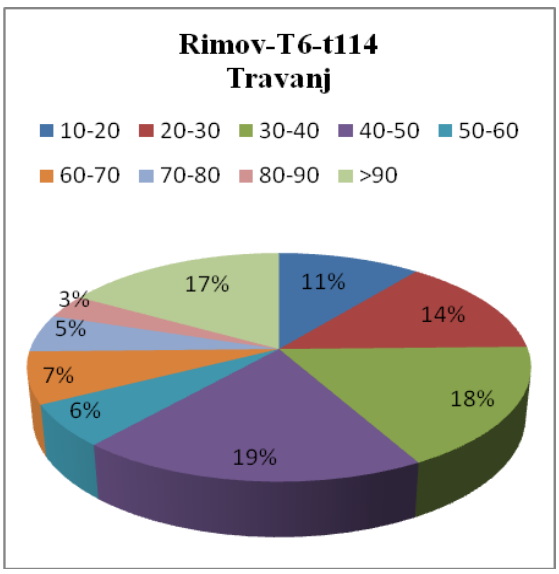
Uzorci sa sojem D5, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 20-30 μm^3 (20%), zatim od 10-20 μm^3 (16%). Također je zabilježen i visoki postotak heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom >90 μm^3 (13%).
Uzorci sa sojem D5, sa lokaliteta Cep pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom >90 μm^3 (50%). Slijedeći po dominaciji su oni sa prosječna volumena70-80 μm^3 (9%).
Uzorci sa sojem KL, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom od 30-40 μm^3 (19%) te s istim postotkom onih prosječna volumena 20-30 μm^3. Uzorci sa sojem KL, s lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom > 90 μm^3 (27%), zatim od 10-20 μm^3 (21%).
Uzorci sa sojem T6, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od 40-50 μm^3 (19%), zatim od 30-40 μm^3 (18%). Uzorci sa sojem T6, s lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom > 90 μm^3 (35%), zatim od 30-40 μm^3 (13%).
Navedeni rezultati govore nam kako se volumen heterotrofnih bičaša u Rimovu pomaknuo prema većim dimenzijama no i dalje su najzastupljeniji oni manjeg volumena (otprilike od 10 do 50 μm^3). Na lokalitetu Cep situacija je drugačija, kod gotovo svih tretmana gdje su se nalazili testirani sojevi, dominiraju heterotrofni bičaši prosječnog volumena većeg od 90 μm^3. Navedeni rezultati prikazani su slikom 27.

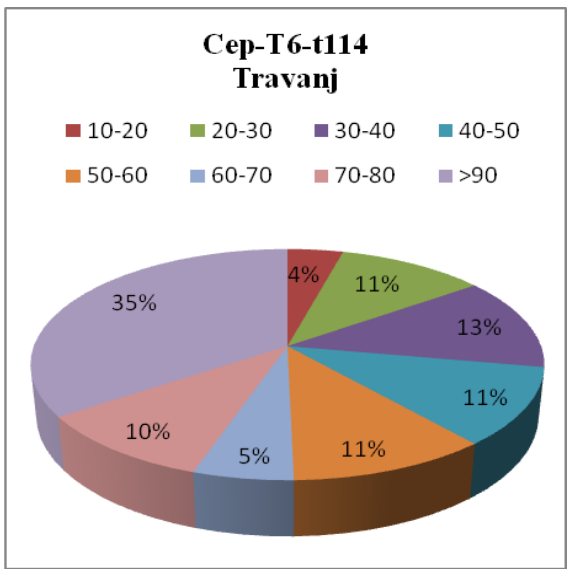

Rimov-D5-t114
Travanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
16%
20%
14%
9%
9%
7%
7%
5%
13%


Cep-D5-t114
Travanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
5%
4%
5%
8%
7%
7%
9%
5%
50%


Rimov-KL-t114
Travanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
7%
19%
19%
16%
11%
9%
5%
5%
9%


Cep-KL-t114
Travanj
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
>90
5%
21%
19%
9%
6%
7%
6%
27%


Rimov-T6-t114
Travanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
11%
14%
18%
19%
6%
7%
5%
3%
17%


Cep-T6-t114
Travanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
>90
4%
11%
13%
11%
11%
5%
10%
35%

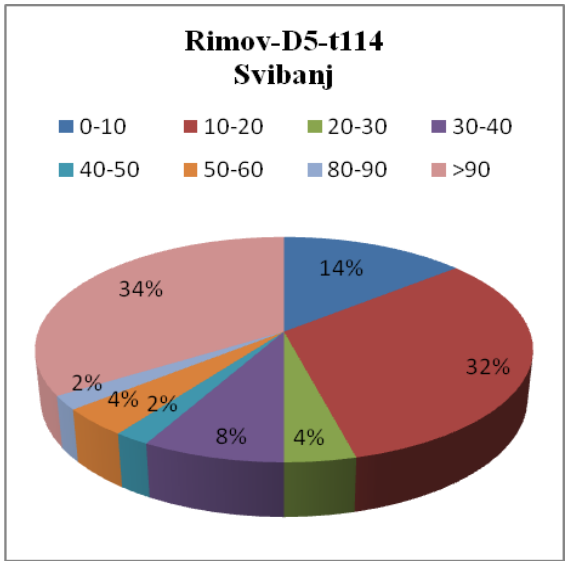
Slika 27. Grafički prikaz raspodjele volumena heterotrofnih bičaša u uzorcima gdje su se nalazili sojevi D5, KL i T6, u vremenu t_{114} u travnju i svibnju. Vrijednosti prikazane grafom predstavljaju zapravo broj heterotrofnih bičaša određenog volumena koji je izmjeren u vremenu t_{114} u uzorcima gdje su se nalazili testirani sojevi, pretvoren u postotke. Raspon veličina u grafu označen je različitim bojama i predstavlja volumen heterotrofnih bičaša u μm^3.

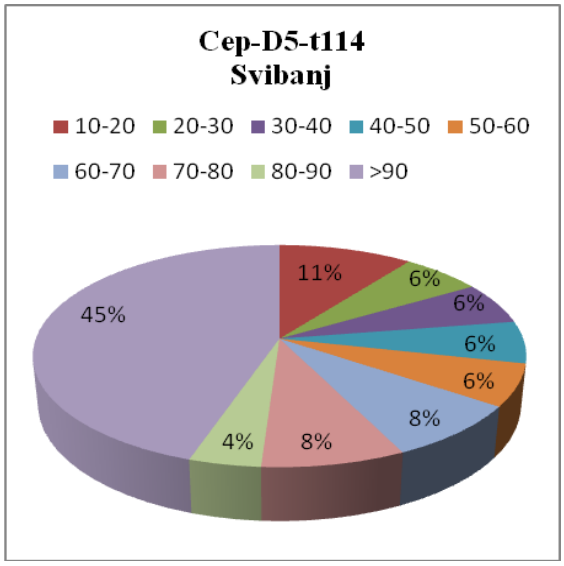
4.3.3.2. Svibanj

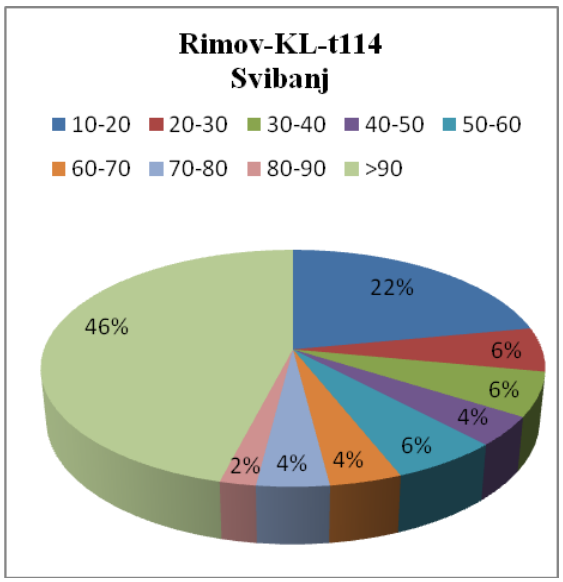
Uzorci sa sojem D5, sa lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša s prosječnim volumenom $> 90\ \mu m^3$ (34%), zatim od 10-20 μm^3 (32%). Uzorci sa sojem D5, s lokaliteta Cep pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom $>90\ \mu m^3$ (45 %). Slijedeći po dominaciji su oni sa prosječna volumena 10-20 μm^3 (11%).
Uzorci sa sojem KL, sa lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom $> 90\ \mu m^3$ (46%), zatim sa volumenom od 10-20 μm^3 (22%). Uzorci sa sojem KL, sa lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom $> 90\ \mu m^3$ (38%), zatim od 20-30 μm^3 (16%).
Uzorci sa sojem T6, s lokaliteta Rimov pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom od većim od 90 μm^3 (32%) , zatim od 10-20 μm^3 (14%). Uzorci sa sojem T6, sa lokaliteta Cep, pokazuju dominaciju heterotrofnih bičaša sa prosječnim volumenom $> 90\ \mu m^3$ (42%), zatim od 50-60 μm^3 (18%).

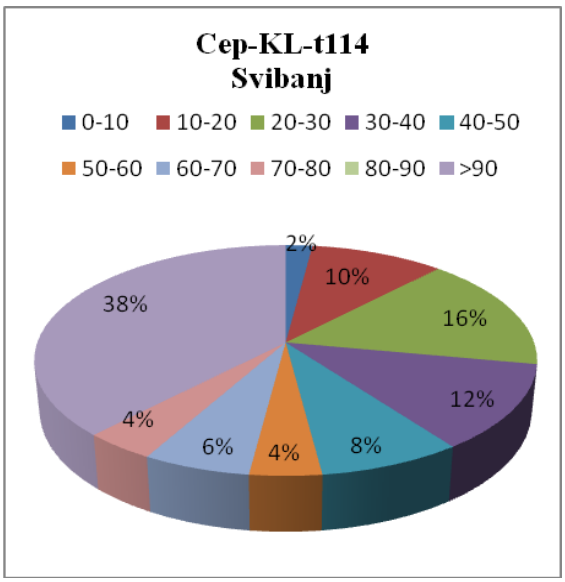
Navedeni rezultati govore nam kako se volumen heterotrofnih bičaša u tretmanima sa oba lokaliteta pomaknuo prema heterotrofnim bičašima volumena većeg od 90 μm^3 no odmah poslije njih po zastupljenosti su manji heterotrofni bičaši prosječnog volumena od 10 do 30 μm^3.

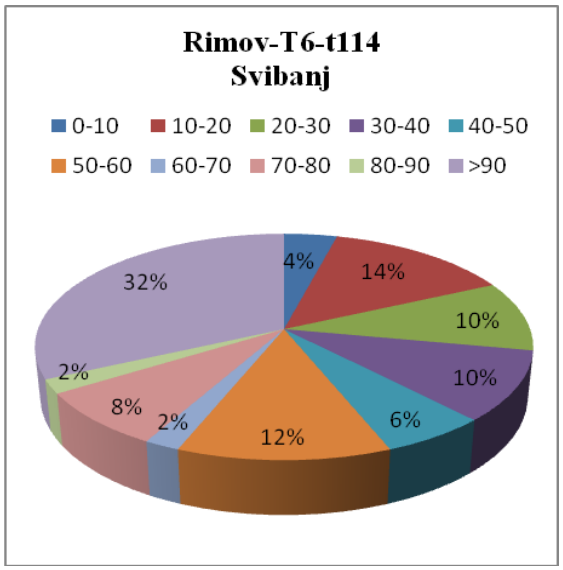
Navedeni rezultati prikazani su slikom 28.

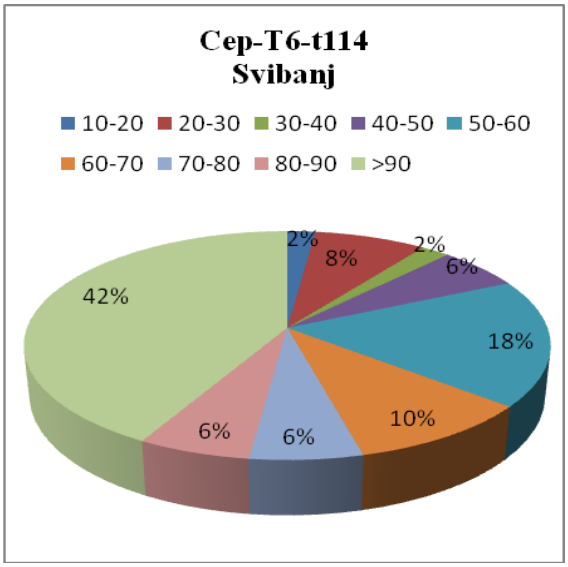

Rimov-D5-t114
Svibanj
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
80-90
>90
14%
32%
4%
8%
2%
4%
2%
34%


Cep-D5-t114
Svibanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
11%
6%
6%
6%
6%
8%
8%
4%
45%


Rimov-KL-t114
Svibanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
22%
6%
6%
4%
6%
4%
4%
2%
46%


Cep-KL-t114
Svibanj
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
2%
10%
16%
12%
8%
4%
6%
4%
4%
38%


Rimov-T6-t114
Svibanj
0-10
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
4%
14%
10%
10%
6%
12%
2%
8%
2%
32%


Cep-T6-t114
Svibanj
10-20
20-30
30-40
40-50
50-60
60-70
70-80
80-90
>90
2%
8%
2%
6%
18%
10%
6%
6%
42%

Slika 28. Grafički prikaz raspodjele volumena heterotrofnih bičaša u uzorcima gdje su se nalazili sojevi D5, KL i T6, u vremenu t_{114} u travnju i svibnju. Vrijednosti prikazane grafom predstavljaju zapravo broj heterotrofnih bičaša određenog volumena koji je izmjeren u vremenu t_{114} u uzorcima gdje su se nalazili testirani sojevi, pretvoren u postotke. Raspon veličina u grafu označen je različitim bojama i predstavlja volumen heterotrofnih bičaša u μm^3.

5. RASPRAVA

Poznato je kako bakterije roda *Limnohabitans* imaju vrlo visoku stopu rasta (Šimek i sur., 2006) vjerovatno predstavljajući visoko kvalitetnu hranu koja podržava brzi rast prirodnih zajednica heterotrofnih bičaša. Ovoj teoriji ide u prilog to što je nedavno testirano još četiri neopisana soja roda *Limnohabitans* (Kasalicky i sur., u tisku) koji također pokazuju brzi rast zajednica heterotrofnih bičaša. Rezultati ovoga rada potvrđuju prijašnja nagađanja, temeljena na preliminarnim indirektnim dokazima ključne uloge ovih bakterija u toku ugljika od organskih supstanci izvedenih od algi (algal-derived organic substances) (Šimek i sur., 2010, 2011) prema hranidbenom lancu grejzera (Jezbera i sur., 2005).

U ovom radu korišten je inovativan dizajn eksperimenta, temeljen na pristupu potrošnje plijena (Montagnes i sur., 2008) u šestodnevnom eksperimentu sa zajednicama heterotrofnih bičaša koje su uspostavljene nakon 36 sati inkubacije i filtrirane kroz filter pora 5µm kako bi bile oslobođene metazooplanktona. No, u prirodi u pelagijalu se događa mnogo veća smjena zajednica kao odgovor na fitoplanktonsku sukcesiju povezanu sa cvjetanjem bakterija (npr. Eiler i Bertilsson, 2004) koja traje par dana ili tjedana. Testirani sojevi dodani su u tretmane u visokim koncetracijama kako bi prekrili pozadinu prirodne bakterioplanktonske mase prisutne u tretmanima te kako bi rast heterotrofnih bičaša mogli pripisati određenom plijenu koji dominira u zajednici. Zbog povećanja pritiska grejzinga u 5µm-arskim tretmanima, prisutnost bakterija koje se prirodno pojavljuju u vodi značajno je smanjena nakon 36 sati inkubacije i većinom je sastavljena od filamenata i formi otpornih na grejzing (Jurgens i Matz, 2002) ili od bakerijske biomase koja vjerovatno nema značenje za heterotrofne bičaše u odnosu na plijen. Tjekom dva provedena eksperimenta, brojnost heterotrofnih bičaša povećavala se kao odgovor na bakterijski plijen. Najveće povećanje brojnosti HNF zabilježeno je u prisustvu bakterijskog soja T6 nakon 66 sati eksperimenta u travnju, na oba lokaliteta. U svibnju se brojnost HNF pokazala nešto drugačijom, najveća brojnost na lokalitetu Rimov zabilježena je u prisustvu soja D5, ali soj T6 pokazuje tek nešto manju brojnost te razlika između njih nije bila statistički značajna ($p>$od 0,05). Kod lokaliteta Cep ponovno je zabilježena najveća brojnost HNF u prisustvu soja T6.

Specifična stopa rasta heterotrofnih bičaša na ponuđenim sojevima govori nam kako je najbrži rast, u većini slučajeva zabilježen kod HNF koji su rasli na soju T6, osim na lokalitetu Cep gdje je u travnju najbrži rast zabilježen u prisustvu soja D5. No, najbrži rast ne znači ujedno i

najveći. Podatci o duljini lag faze (faze mirovanja ili prilagodbe) razlikoveli su se od lokaliteta do lokaliteta i mjeseca eksperimenta. Najdužu lag fazu u travnju na oba lokaliteta pokazuju HNF na soju D5. Soj T6 pokazuje najkraću fazu na oba lokaliteta. Zanimljivo je napomenuti kako soj KL koji nije pokazao veliki prirast brojnosti kao ni brzi rast ima kraću lag fazu od soja D5. Statistički značajne razlike u duljinama lag faze zabilježene su između lokaliteta, dok unutar lokaliteta nije bilo značajnih razlika. U svibnju je situacija bila malo drugačija nego u travnju pa je najkraća lag faza na lokalitetu Rimov zabilježena kod soja D5 a najduža kod soja KL. Međutim, rezultati statističke analize (one way ANOVA, popraćena Tukey testom) govore kako ne postoje značajne razlike između testiranih sojeva unutar jednog lokaliteta već samo između lokaliteta s tim da se soj KL iz Rimova i soj T6 iz Cepa statistički značajno ne razlikuju.

Zabilježeno je također i povećanje biomase heterotrofnih bičaša na ponuđenim sojevima i najveće je povećanje zabilježeno tjekom oba eksperimenta u prisustvu soja T6.

Prema svemu navedenom možemo reći kako se soj T6 pokazao kao najpogodnija hrana za heterotrofne bičaše iako oni pokazuju značajan rast na sva tri soja. Kombinacija visoke stope rasta i kratke lag faze heterotrofnih bičaša, kojima je ponuđen određeni bakterijski plijen, pokazuje najkvalitetniju hranu ili „minimalno vrijeme prilagodbe“ na ponuđeni plijen. Soj T6 se upravo u većini slučajeva pokazao kao takav. Soj D5 također pokazuje visoku stopu rasta, u nekim slučajevima i višu nego T6 no i dužu lag fazu. Soj KL pokazuje kraću lag fazu ali nižu stopu rasta kao i najmanju brojnost. Možemo reći kako heterotrofni bičaši kod ova dva soja (KL i D5) pokazuju duže vrijeme prilagodbe što znači izbirljivost, istražuju ima li kvalitetnijeg plijena.

Nije teško uočiti kako postoje razlike u brojnosti, stopi rasta i lag fazama između dva lokaliteta tjekom provedenih eksperimenata. Ovaj trend može se objasniti različitim početnim koncentracijama nutrijenata u travnju i svibnju. Tijekom travnja na lokalitetu Rimov koncentracija nutrijenata (DOC, TP, RP) bila je viša nego na lokalitetu Cep. Tjekom svibnja koncentracija nutrijenata niske su na oba lokaliteta s time da je na lokalitetu Cep niža. Neki znanstvenici kategorizirali su trofički status prema koncentracijama fosfora u vodi. Jezera sa koncentracijama fosfora ispod 0,010 mg/L klasificiraju se kao oligotrofna, jezera sa koncentracijom fosfora između 0,010 mg/L i 0,020 mg/L su mezotrofna a eutrofna su ona kod kojih koncentracija fosfora prelazi 0,020 mg/L (Muller i Hessel, 1999). Prema ovoj klasifikaciji Rimov se pokazao kao mezo-eutrofan što je u skladu sa prijašnjim istraživanjima.

Jezero Cep se prema ovoj klasifikaciji pokazalo oligotrofno. Poznato je kako su eutrofna jezera bogata nutrijentima, a samim time imaju i visoku stopu primarne produkcije, dok su oligotrofna siromašna nutrijentima. Prema koncentracijama otopljenog organskog ugljika (DOC) oba lokaliteta možemo svrstati u mezotrofna (2-4 mg/L). Prema navedenom možemo objasniti kako su u Cepu pokazane niže stope rasta, lag faza i niža brojnost zbog niske koncentracije nutrijenata. Ista situacija u svibnju se dogodila na oba lokaliteta. Brojne studije pokazale su kako asocijacija heterotrofnih bičaša sa bakterijama značajno povećava regeneraciju nutrijenata u usporedbi sa samim bakterijama (npr. Eccleston-Parry i Leadbeater 1995), što znači kako je bakterijama u tretmanima iz Cepa trebalo određeno vrijeme kako bi počele brže rasti i kako bi samim svojim rastom potaknule brži odgovor heterotrofnih bičaša. Ovim radom također je pokazano kako u različitim vremenskim fazama eksperimenta dolazi do promjene u volumenu heterotrofnih bičaša, od manjih koji su u većem broju prisutni na početku eksperimenta do većih koji prevladavaju krajem eksperimenta. Ovaj pomak u brojnosti od manjih na početku do većih na kraju eksperimenta vjerovatno se događa jer bakterijski plijen različito oblikuje zajednice heterotrofnih bičaša. Kako bi se ovo moglo sa sigurnošću potvrditi trebalo bi napraviti pirosekvencioniranje prokariotskih zajednica da bi se točno utvrdilo o kojim se zajednicama radi. Ovo je bitan faktor u potvrđivanju ove pretpostavke jer je možda ova promjena u veličinama heterotrofnih bičaša, koja nastupa kada oni postižu maksimalan broj i postaju limitirani hranom, djelomično uzrokovana uklanjanjem metazooplanktona (Jurgens i Matz 2002). Metazooplankton u prirodi efikasno uklanja veće heterotrofne bičaše i zato manji bičaši često dominiraju slatkovodnim planktonom (Šimek i sur. 1997; Nolte i sur. 2010). Potrebna su daljna istraživanja heterotrofnih bičaša kako bi se ovo moglo sa sigurnošću tvrditi.

Na kraju valja napomenuti, kako su ovakva istraživanja važna jer se proces samopročišćenja i sveukupne produktivnosti slatkovodnih sustava temelji na bakterijskoj produkciji i njenom uklanjanju putem bakteriovora.

6. ZAKLJUČAK

- Tjekom provedenih eksperimenata zabilježen je statistički značajan porast brojnosti heterotrofnih bičaša u sva tri testirana tretmana, kao odgovor na bakterijski plijen.
- Specifična stopa rasta kao i prinos brojnosti heterotrofnih bičaša zabilježeni su u tretmanu T6. Najdužu lag fazu pokazuju heterotrofni bičaši u tretmanu D5 u travnju i u tretmanu KL u svibnju.
- Rezultati biomase pokazuju povećanje biomase heterotrofnih bičaša i smanjenje biomase bakterija.
- Volumen heterotrofnih bičaša mjenja se od početka eksperimenta kada postoji manja raznolikost u veličinama i dominiraju manji pojedinci, dok pred kraj dominiraju veći što ukazuje na to da bakterijski plijen različito oblikuje zajednice heterotrofnih bičaša.
- Glavni cilj ovoga rada bio je odrediti nutritivnu vrijednost bakterija roda *Limnohabitans* koje su predstavljale plijen za heterotrofne bičaše. Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti kako sva tri soja iz roda *Limnohabitans* podržavaju rast heterotrofnih bičaša, no kombinacija kratke lag faze i visoke stope rasta heterotrofnih bičaša kao reakcija na određeni plijen pokazuje visoku nutritivnu kvalitetu soja T6.

7. LITERATURA

1. Boenigk J i Hartmunt A (2002) Bacteriovory by heterotrophic fllagelates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek* **81:** 465-480

2. Børsheim, K.Y. i Bratbak, G. (1987). Cell volume to cell carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Marine Ecology Progress Series* **36:**171-175

3. Cottrel M i Kirchman D (2002) Community Composition of Marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5116-5112

4. Crump B i Hobbie J (2005) Synchrony and seasonality in bacterioplankton communities of two temperate rivers. *Lymnology and Oceanography* **50(6):** 1718–1729

5. Eccleston-Parry, J. D., i B. S. C. Leadbeater (1995) Regeneration of phosporus and nitrogen by four species of heterotrophicnanoflagellates feeding on three nutritional states of a singel bacterial strain. Applied Environmental Microbiology **61:** 1033-1038

6. Eiler A i Bertilsson S (2004) Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology* **6:** 1228–1243

7. Fenchel T (1986a) The ecology of heterotrophic flagellates. In: Marshall KC (Ed) *Advances in Microbial Ecology* (pp 57–97)

8. Grossart H. P., Jezbera. J., Hornak. K., Hutalle, K. M., Buck U., Šimek K., (2008) Top-down and bottom up induced shifts in bacterila abundance, production and community composition in an experinetally divided humic lake. *Environmental Microbiology* **10(3):** 635-652

9. Hahn, M.W., Kasalický, V., Jezbera, J., Brandt, U., Jezberová, J., and K. Šimek (2010) *Limnohabitans curvus gen. nov., sp. nov.,* a planktonic bacterium isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 2946–2950

10. Hahn MW, Scheuerl T, Jezberová J, Koll U, Jezbera J, Šimek K. *et al.* (2012): The passive yet successful way of planktonic life: genomic and experimental analysis of the ecology of a planktonic *Polynucleobacter* population. *PLoS ONE* **7(3):** e32772.

11. Hornák K, Jezbera J, Nedoma J, Gasol JM, Šimek K (2006) Effects of resource availability and bacterivory on leucine incorporation in different groups of freshwater bacterioplankton, assessed using microautoradiography. *Aquatic Microbial Ecology* **45:** 277-289

12. Jezbera J, Horňák K, Šimek K. (2005). Food selection by bacterivorous protists: insight from the analysis of the food vacuole content by means of fluorescence in situ hybridization. *FEMS Microbial Ecology* **52:** 351–363.

13. Jürgens K, Matz C. (2002). Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **81:** 413–434.

14. Kasalický, V., Jezbera, J.,Šimek, K., and M.W. Hahn (2010) *Limnohabitans planktonicus sp. nov.* and *Limnohabitans parvus sp. nov*., planktonic *Betaproteobacteria* isolated from a freshwater reservoir, and emended description of the genus Limnohabitans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 2710-2714

15. Kerner M, Hohenberg H, Ertl S, Reckermannk M, Spitzy A (2003) Self-organization of dissolved organic matter to micelle-like microparticles in river water. *Nature*

16. Kopáček, J. and J. Hejzlar, 1993. Direct determination of particulate phosphorus in water with perchloric acid digestion of whole membrane filters. *International Journal Environmental and Analytical Chemistry* **54:** 27-30.

17. Montagnes DJS, Barbosa AB, Boenigk J, Davidson K, Jürgens K, Macek M *et al.* (2008). Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquatic Microbial Ecology* **53:** 83–98.

18. Mueller, David K. i Helsel, Dennis R. 1999. "Nutrients in the Nation's Waters--Too Much of a Good Thing?" *U.S. Geological Survey Circular 1136*. National Water-Quality Assessment Program.

19. Norland S (1993) The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp PF, Sherr BF, Sherr EB, Cole JJ (eds) Aquatic microbial ecology. Lewis Publishers, Boca Raton, p 303–307

20. Salcher MM, Pernthaler J, Zeder M, Psenner R, Posch T. (2008). Spatio-temporal niche separation of planktonic *Betaproteobacteria* in an oligo-mesotrophic lake. *Environmental Microbiology* **10:** 2074–2086.

21. Patterson DJ (1999) The diversity of eukaryotes. The American Naturalist **154:** S96–S124

22. Percent, S. F., Frischer, M.E., Vescio, P. A., Duffy, E. B., Milano, V., McLellan, M., Stevens, B. M., Boylen, C. W. & Nierzwicki-Bauer, S. A. (2008). Bacterial community structure of acid-impacted lakes: what controls diversity? *Applied Environmental Microbiology* **74:** 1856-1868.

23. Peréz MT, Sommaruga R. (2006). Differential effect of algal- and soil-derived dissolved organic matter on alpine lake bacterial community composition and activity. *Limnology and Oceanography* **51:** 2527–2537.

24. Pernthaler J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Reviews Microbiology* 3: 537–546.

25. Porter, K.G. and Y.S. Feig (1980). The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora, *Limnology and Oceanography* **25:** 943-948

26. Salcher MM, Pernthaler J, Zeder M, Psenner R, Posch T. (2008). Spatio-temporal niche separation of planktonic *Betaproteobacteria* in an oligo-mesotrophic lake. *Environmental Microbiology* **10:** 2074–2086.

27. Shaw, A.K., Halpern, A. L., Beeson, K., Tran, B., Venter, J.C. & Martiny, J.B. (2008). It's all relative: ranking the diversity of aquatic bacterial communities. *Environmental Microbiology* **10:** 2200-2210.

28. Sherr & Sherr (2002) Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs. *Antonie van Leeuwenhoek J G* **81:** 293–308.

29. Šimek K, Hartman P, Nedoma J, Pernthaler J, Vrba J, Springmann D, *et al.* (1997). Community structure, picoplankton grazing and zooplankton control of heterotrophic nanoflagellates in a eutrophic reservoir during the summer phytoplankton maximum. *Aquatic Microbial Ecology* **12:** 49-63.

30. Šimek K, Pernthaler J, Weinbauer MG, Horňák K, Dolan JR, Nedoma J. *et al.* (2001). Changes in bacterial community composition, dynamics, and viral mortality rates associated with enhanced flagellate grazing in a mesoeutrophic reservoir. *Applied Environmental Microbiology* **67:** 2723–2733.

31. Šimek K, Horňák K, Jezbera J, Nedoma J, Vrba J, Straškrabová V. *et al.* (2006). Maximum growth rates and possible life strategies of different bacterioplankton groups in relation to phosphorus availability in a freshwater reservoir. *Environmental Microbiology* **8:** 1613–1624.

32. Šimek K, Horňák K, Jezbera J, Nedoma J, Znachor P, Hejzlar J, Seda J (2008). Spatio-temporal patterns of bakterioplankton production and community composition related to phytoplankton composition and protistan bacteriovory in a dam reservoir. *Aquatic Microbial Ecology* **51:** 249-262.

33. Šimek K, Kasalický V, Jezbera J, Jezberová J, Hejzlar J, Hahn MW (2010). Broad habitat range of the phylogenetically narrow R-BT065 cluster, representing a core group of the betaproteobacterial genus *Limnohabitans*. *Applied Environmental Microbiology* **76**: 631–639.

34. Šimek K, Kasalický V, Zapomělová E, Horňák K. (2011). Algal-derived substrates select for distinct betaproteobacterial lineages and contribute to niche separation in *Limnohabitans* strains. *Applied Environmental Microbiology* **77:** 7307–7315**.**

35. Taylor A. and Joint I. (1990). A Steady-state analysis of the "microbila loop" in stratified systems. *Marine Ecology Progress Series* **59**: 1-17

36. Zwart, G., Crump, B. C., Kamst-van Agterveld, M. P., Hagen, F. and Han M. (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic microbial ecology* **28**:, 141–155.

WEB STRANICE:

web1-http://www.esf.edu/efb/schulz/Limnology/bacteria.html (12.1.2013)

web2-http://www.risy.cz/cs/krajske-ris/jihocesky-kraj/regionalni-informace/o-kraji/ (20.2.2013)

web3-(http://www.hotelklor.com/okoli-hotelu/rimovska-prehrada-36.html (20.2.2013.

web4-http://www.cestujemesdetmi.cz/?p=39632 (20.2.2013)