

**UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
STUDIJSKI PROGRAM BIOLOGIJA**

Jokanović Sandra

**Filogenetska analiza bakterijskih
zajednica u sedimentima Crnogorskog
primorja i procjena uticaja polutanata na
njihovu distribuciju i strukturu**

Doktorska disertacija

Podgorica, 2021

UNIVERSITY OF MONTENEGRO
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS
STUDY PROGRAM BIOLOGY

Jokanović Sandra

**Phylogenetic analysis of bacterial
communities in the sediments of the
Montenegrin coast and assessment of the
impact of pollutants on their distribution
and structure**

Doctoral Dissertation

Podgorica, 2021

DOKTORAND

Ime i prezime: **MSc Sandra Jakanović**

Datum rođenja: 02.11.1982

Naziv završenog studijskog programa i godina završetka:

- Studijski program biologija, diplomirani biolog, 2007. godina;
- Studijski program biologija – smjer ekologija, specijalističke studije, 2012. godina;
- Studijski program biologija – smjer ekologija, master studije, 2014. godina

UDK, OCJENA I ODBRANA DOKTORSKE DISERTACIJE

Datum prijave doktorske teze: 01.12.2016

Datum sjednice Senata Univerziteta na kojoj je prihvaćena teza: 16.10.2017

PODACI I INFORMACIJE O ČLANOVIMA KOMISIJE

Komisija za ocjenu podobnosti teze i kandidata:

Dr. Svetlana Perović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Podgorica, mentor

Dr. Sandi Orlić, viši naučni saradnik, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Dr. Slađana Krivokapić, vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije:

Dr. Svetlana Perović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Podgorica

Dr. Sandi Orlić, viši naučni saradnik, Institut Ruđer Bošković, Hrvatska, Zagreb

Dr Slađana Krivokapić, vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Podgorica

Dr. Vesna Mačić, viši naučni saradnik, Univerzitet Crne Gore, Institut za biologiju mora, Kotor

Dr. Andrej Perović, redovni profesor, Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Podgorica

Datum odbrane: 31.08.2021

Rezime

Obalni ekosistem je najčešće ugrožen eutrofikacijom, otpadnim vodama, hemijskim zagađenjem, industrijom, turizmom, lučkim aktivnostima. Stoga su marinski sedimenti posebno pod uticajem djelatnosti čovjeka. Marinski mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u regulaciji i transformaciji glavnih bioaktivnih elemenata kao i degradaciji organskih polutanata. Brzo se razmnožavaju i odgovaraju na promjene u morskoj sredini, stoga služe kao ekološki indikatori i biomonitori promjena.

Glavni cilj ovog istraživanja je bio utvrditi da li i u kojoj mjeri PAH, PCB, nutrijenti (TN, TP, NH₃), TOC, granulometrički sadržaj utiču na strukturu bakterijskih zajednica u sedimentima Crnogorskog primorja. Struktura bakterijskih zajednica analizirana je sekvenciranjem nove generacije (NGS)-Illumina. Područje ispitivanja se odnosi na osam lokacija u Bokotorskom zalivu: Luka Kotor (KTR), Risan (RSN), Sveta Nedelja (STN), Tivat uvala (TVC), Tivat centar (TVT), Brodogradilište Bijela (SBL), Herceg Novi (HRN), Igalo (IGL) i tri lokacije van zaliva a to su: Budva marina (BDV), Luka Bar (PBR), Ada Bojana (ADB). Lokacije SBL i PMN su definisane kao visoko zagađene u odnosu na PAH i PCB sadržaj prelazeći dozvoljene kriterijume. Na lokaciji KTR izmjereno je najveći sadržaj TOC, TN, TP. Ukupni PAH, TOC i muljeviti sadržaj sedimenta statistički imaju najveći uticaj na varijacije bakterijskih zajednica. Najveći uticaj na bakterijske zajednice na SBL lokaciji ima PAH i PCB sadržaj, što se manifestuje i do tri puta povećanom abundancom *Alphaproteobacteria*. Na ovoj lokaciji zabilježene su i najniže vrijednosti diverziteta zajednica i bogatstva vrsta. Bakterijske zajednice koje pripadaju BRC1, *Dadabacteria* i *Spirochaetes* (iako nisko abundantne) prisutne su samo na lokaciji SBL, što ukazuje na njihovu otpornost i potencijalnu mogućnost razgradnje aromatičnih jedinjenja. Sulfat redukujuće bakterije (SRB) kojoj pripada familija *Syntrophobacteraceae* kao i *Thermoanaerobaculaceae* najveću abundancu pokazuju u unutrašnjem i središnjem dijelu Bokotorskog zaliva. Porodica *Woeseiaceae* (*Steroidobacterales*) najveću brojnost dostiže na estuarijnom području ADB, visoko su korelisani sa TOC sadržajem. . Ova lokacija ocijenjena je kao najmanje zagađena čemu doprinosi pjeskovita struktura sedimenta i smanjena mogućnost adsorpcije.

Za upoređivanje funkcionalnih sposobnosti povezanih sa biodegradacijom aromatičkih komponenti i aktivnog transportnog sistema korišten je bioinformatički alat PICRUSt2. Frekvencija gena koji kodiraju degradaciju aromatičkih jedinjenja su značajno veći na SBL lokaciji.

Geni koji kodiraju ABC (ATP-vezujući kasetni transporter) transportne proteine povezani su sa biotinom, ureom, glicerolom, polisaharidima, fosfatnim transportnim sistemom, metionin transportom sa najvećom frekvencijom gena na SBL lokaciji da bi bakterijske zajednice ispunile metaboličke zahtjeve za rast i opstanak u zagađenom sedimentu.

Ključne riječi: Sediment, bakterijske zajednice, Crnogorsko primorje, sekvenciranje, aromatična hidrokarbonska jedinjenja, nutrijenti, PICRUSt, zagađenje.

Naučna oblast: Ekologija

Uža naučna oblast: Ekološka mikrobiologija

Abstract

The coastal ecosystem is endangered by eutrophication, wastewaters, chemical pollution, industry, tourism, port activities. Marine sediments are particularly exposed to human activities. Marine microbes play a crucial role in regulating and transforming major bioactive elements as well as in the degradation of organic pollutants. They have fast growth rates, promptly respond to environmental perturbations. Bacterial diversity can be used as a measure in assessing the harmful effects on the ecosystem. The main goal of this study revealed the influence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP), ammonia (NH₃) on bacterial communities in sediments of Montenegrin coast. Bacterial composition was analyzing by Next Generation Sequencing (NGS)- Illumina. Area of investigation included: Port of Kotor (KTR), Risan (RSN), St.Nedelja (STN), Tivat cove (TVC), Tivat center (TVT), Shipyard Bijela (SBL), Herceg Novi (HRN), Igalo (IGL), and three locations outside the Bay: Budva (BDV), Port of Bar (PBR), Ada Bojana (ADB). Two stations (SBL and PMN) were defined as very high PAH and PCB polluted sediments exceeding threshold values. In KTR locations was measured the highest content of TOC, TP, TN. Total PAH, TOC, silt content had a statistically significant influence on bacterial diversity variation. The influence of PAH and PCB in the most polluted SBL site was manifested as a three fold time increased abundance of *Alphaproteobacteria*. In this location was recorded the lowest richness and diversity. Bacterial communities affiliated to BRC1, *Dadabacteria*, *Spirochaetes* (although low abundance) inhabit the only sediment of SBL location indicating their persistence and possible potential for degradation of aromatic compounds. Members of sulfate reducing bacteria (SRB) *Syntrophobacteraceae* and *Thermoanaerobaculaceae* counted higher relative abundance in the inner and middle part of the Boka Kotorska Bay. Our data highlighted the presence of the family *Woeseiaceae* especially at ADB station where a high correlation with TOC was determined. The lowest PAH and PCB content was detected at the estuary station ADB. These might be attributed to the sandy sediment fraction, which decreases the adsorption capacity. To compare the functional capabilities potentially related to biodegradation of aromatic compounds and the active transport system, bioinformatics tool PICRUSt was used to predict metagenomes of the sediment.

The frequency of the genes involved in aromatic compounds was significantly higher in the SBL station. Genes coding for the ABC transporter (ATP-binding cassette transporter) proteins were associated with biotin, urea, glycerol, polysaccharide, phosphate transport system, methionine transport system with higher frequency at the SBL station to fulfill metabolic requirements for the growth and persistence of microbe growing in the polluted sediment.

Key words: Marine sediment, Bakterijske zajednice, Montenegrin coast, sequencing, aromatic hydrocarbon compounds, nutrients , PICRUSt, pollution.

Scientific area: Ecology

Special scientific area: Microbial ecology

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je realizovana u okviru bilateralnog projekta Crna Gora – Hrvatska: Filogenetska analiza bakterijskih zajednica u sedimentu Boke Kotorske (FILOSED, 2015-2017) i STIM-REI projekta finansiran od strane Evropske Unije. (2014-2020).

Ovom prilikom želim da se zahvalim Dr. Sandiju Orliću koji je organizovao eksperimentalni rad na Institutu Ruđer Bošković. On je najviše zaslužan što je ova doktorska disertacija ugledala svijetlo dana. Hvala na zalaganju, idejama i svim sugestijama koje su učinile da moje profesionalno iskustvo bude bogatije i naučni radovi kvalitetniji.

Srdačno se zahvaljujem mojoj mentorki Dr. Svetlani Perović na stručnoj podršci i korisnim savjetima tokom izrade disertacije, na vođenju teorijskog dijela mojih doktorskih studija i vođenju projekta u okviru kojeg su one realizovane.

Veliku zahvalnost dugujem Dr. Vesni Mačić za organizaciju terenskih aktivnosti, finansijsku i moralnu podršku kao i za zalaganje tokom izrade disertacije. Od srca hvala što si uvijek bila tu za mene, uvijek imala lijepu riječ, strpljenja da me saslušaš i spremnosti da pomogneš.

Hvala članu komisije Dr. Slađani Krivokapić na podršci, korisnim savjetima, sugestijama koje su oblikovale ovu doktorsku disertaciju.

Hvala članu komisije Dr. Andreju Peroviću na stručnoj pomoći i savjetima.

U toku izrade ove doktorske disertacije stekla sam još jednog prijatelja. To je Katarina Kajan. Neizmjereno hvala na izdvojenom vremenu, strpljenju, dragocjenoj pomoći oko bioinformatičkih i statističkih analiza, ogromnoj pomoći pri pisanju naučnog rada.

Želim da se zahvalim i Dr. Maji Ivanić na pomoći oko granulometrijskih analiza sedimenta.

Veliku zahvalnost dugujem Dr. Zoranu Kljajiću koji nažalost nije sa nama. Od njega je potekla ideja za istraživanja i saradnju. Hvala Vam profesore na podršci i znanju koje ste nesebično dijelili.

Hvala kolegama iz Centra za ekotoksikološka ispitivanja u Podgorici za pomoć oko hemijskih analiza.

Hvala rukovodstvu Instituta za Biologiju mora u Kotoru: Dr. Mirku Đuroviću kao i Dr. Aleksandru Joksimoviću. Hvala Dr. Branki Pestorić za pomoć oko Ocean Data programa i na iskrenoj podršci.

Hvala Dr. Rajku Martinoviću i Mr. Ani Castelli što sam mogla uvijek da računam na vas. Hvala Dr. Zdravku Ikici i Vladanu Vukoviću za tehničku podršku. Hvala tehničaru Branislavu Lazareviću za veliku pomoć na terenu. Veliko hvala i Mariji Đurović, da uvijek priskoči u pomoć. Zahvaljujem se i Dr. Dragani Drakulović kao i svim kolegama koji su na neki način doprinjeli izradi ove disertacije.

Hvala Igoru Pavkoviću i Vedrani Deretić na podršci.

Hvala mojim roditeljima i bratu Igoru na ljubavi, razumijevanju, požrtvovanju tokom svih godina školovanja. Bez Vas ništa ne bi bilo moguće. I na kraju hvala mom Bojanu i Sari, koji su moja oaza mira, stabilnosti, ljubavi i podrške.

Sandra Jokanović

SADRŽAJ:

1. UVOD	12
2. CILJEVI I HIPOTEZA	14
3. LITERATURNI PREGLED	15
3.1 Karakterizacija sedimenata i uloga bakterija u njima	15
3.2 Organski polutanti u sedimentima	16
3.3 Razlaganje PAH jedinjenja u prirodi	18
3.4 Razvoj metoda u mikrobnoj ekologiji	19
3.5 Pregled istraživanja	22
3.6 Metabolički procesi u sedimentima i karakteristični organizmi	25
3.7 Najbrojnije bakterijske grupe u sedimentima	26
3.8 Alfa i Beta diverzitet	28
4. MATERIJAL I METODE	30
4.1 Područje istraživanja	30
4.1.1 Bokokotorski zaliv	30
4.1.2 Batimetrijske karakteristike i morsko dno	30
4.1.3 Strujanja u Bokokotorskom zalivu	31
4.1.4 Ispitivano područje van zaliva	33
4.2 Metodologija istraživanja	35
4.2.1 Uzorkovanje i odabrane lokacije	35
4.2.2 Analiza hemijskih i granulometrijskih parametara	37
4.2.2.1 PAH i PCB jedinjenja	37
4.2.2.2 PAH deskriptori	38
4.2.2.3 Određivanje ukupnog organskog ugljenika	39
4.2.2.4 Određivanje ukupnog fosfora	39
4.2.2.5 Određivanje ukupnog azota	39
4.2.2.6 Određivanje amonijaka	40
4.3 Mikrobiološka analiza	40
4.3.1 Ekstrakcija DNK	40
4.3.2 Illumina sekvenciranje	42
4.3.3 Bioinformatičke analize	43
4.3.4 Statističke analize	44
5. REZULTATI	45
5.1 Granulometrijska i hemijska karakterizacije sedimenta	45

5.2 Mikrobiološka karakterizacija sedimenta	48
5.2.1 Rezultati dobijeni Illumina sekvenciranjem	48
5.2.2 Alfa i Beta diverzitet ispitanih bakterijskih zajednica.....	49
5.2.3 Struktura bakterijskih zajednica	51
5.3 Povezanost bakterijskih zajednica, hemijskih i granulometrijskih parametara	53
5.4 Analiza učestalosti gena i metaboličkih puteva	57
6. DISKUSIJA	61
6.1 Hemijska komponenta	61
6.2 Mikrobiološka komponenta	64
7.ZAKLJUČCI.....	72
8. LITERATURA.....	74
9. PRILOZI	94

1.UVOD

Morski ekosistem je najveći na planeti i obuhvata 90% biosfere (Munn, 2011). Skoro trećina populacije naseljava priobalne oblasti ili teritorije u blizini mora (Kummu i sar.2016). Obalni ekosistem je najčešće ugrožen eutrofikacijom, hemijskim zagađenjem, otpadnim vodama, lučkim aktivnostima, industrijom i masovnim turizmom (Roussiez i sar., 2006; Rodriguez i sar., 2018). Stoga su marinski sedimenti posebno pod uticajem djelatnosti čovjeka (Halpern i sar. 2008). Mikrobne zajednice predstavljaju najbrojniju frakciju biomase bentosa. U morskom ekosistemu mikroorganizmi igraju ključnu ulogu u regulaciji i transformaciji glavnih bioaktivnih elemenata (ugljenik, azot, fosfor, kiselik, sumpor), recikliranju organske materije u lancu ishrane, kao i degradaciji organskih polutanata (Duran i Cravo-Laureau, 2016; Zoppini i sar., 2019). Predstavici bakterijskih zajednica u moru uključuju heterogene funkcionalne grupe kao što su: primarni proizvođači, fotoheterotrofi, heterotrofi, fiksatori azota, nitrifikatori, denitrifikatori. (Kirchman, 2008).

Bakterije su najbrojnija komponenta mikrobiološke zajednice, veličinske frakcije od 0.2 - 2 μ m. Brzo se razmnožavaju i odgovaraju na promjene u životnoj sredini, stoga služe kao ekološki relevantni indikatori i biomonitori promjena u morskoj sredini (Paerl i sar., 2003; Ager i sar., 2010). Kontaminanti doprinose redukciji biodiverziteta, promjenama u sastavu zajednice, supstituciji senzitivnih vrsta sa više tolerantnim vrstama (Ager i sar., 2010; Zoppini i sar., 2019).

Mnogi zagađivači kao što su: policiklična aromatična hidrokarbonska jedinjenja (PAH), polihlorovani bifenili (PCB), metali, polutanti iz otpadnih voda zbog svoje hidrofobne prirode nisu biorazgradivi pa se akumuliraju u marinskim sedimentima. Predstavljaju karcinogene, mutagene i toksične supstance. Zbog toga su sedimenti perzistentni izvor zagađenja u akvatičnom ekosistemu (Louvado i sar., 2015; Duran i Cravo-Laureau, 2016; Ghosal i sar., 2016).

Prepoznavanje bakterija i određivanje strukture njihovih zajednica usko je vezano uz korištenje molekularnih metoda zasnovanih na genu za 16S rRNK koje omogućuju prepoznavanje svih do sada poznatih grupa, a veliki broj novih bakterijskih zajednica je prepoznat koristeći tehnologiju sekvenciranja nove generacije NGS (eng. Next Generation Sequencing) (Choi i sar., 2016).

Usled sve većeg razvoja pomorskih i nautičkih aktivnosti kao i ubrzane urbanizacije na Crnogorskom primorju od velikog je značaja ispitati bakterijsku raznolikost u sedimentu, posebno na mjestima podložnim kontaminaciji i utvrditi da li i u kojoj mjeri zagađivači mijenjaju strukturu bakterijskih zajednica i utiču na frekvenciju gena zaduženih za metaboličke puteve i ABC transportne proteine. Rezultati ovog istraživanja predstavljaju prve podatke bakterijskih zajednica u morskom sedimentu Crnogorskog primorja a time i osnovu daljih istraživanja.

2. CILJEVI I HIPOTEZA

Ciljevi istraživanja su:

- Istražiti strukturu bakterijskih zajednica na dvanaest odabranih lokacija u sedimentima Crnogorskog primorja metodom Illumina sekvenciranja
- Determinisati kvalitet sedimenta na osnovu hemijskih parametara
- Ispitati potencijalni uticaj PAH i PCB polutanata, nutrijenata kao i granulometrijskih parametara na mikrobne zajednice u sedimentu
- Pomoću PICRUST2 softvera odrediti učestalost gena za razgradnju aromatičnih jedinjenja i ABC transportnih proteina
- Utvrditi povezanost metaboličkih puteva i ABC transportnih proteina sa ispitanim hemijskim parametrima u sedimentu

Osnovna hipoteza je zasnovana na tome da polutanti koji se akumuliraju u sedimentima morskog dna mijenjaju strukturu bakterijskih zajednica usled selektivnog pritiska i utiču na metaboličke puteve

3. LITERATURNI PREGLED

3.1 Karakterizacija sedimenata i uloga bakterija u njima

Sediment predstavlja složenu i filogenetski raznovrsnu sredinu koja se sastoji od organskih i neorganskih čestica okruženih intercostijalnom vodom. Sediment sadrži fragmente stijena i ostatke životinja, uglavnom djelove skeleta i ljuštura.

Sedimenti se po svom porijeklu mogu podijeliti na :

- **Biogeni sediment:** Sastoji se od skeletnih ostataka fitoplanktonskih i bentosnih morskih organizama. Najveći dio kalcijum karbonata koji se taloži u moru je biogenog porijekla. Na šelfu preovladavaju ostaci bentosnih organizama a u dubokomorskim sedimentima raste udio planktonskih ostataka. Udio biogenog sedimenta u morskom ekosistemu iznosi oko 62%.

- **Terigeni sedimenti** vode porijeklo sa kopna i čine ih čestice koje vjetrom, rijekama dolaze u more a nastaju mehaničkim trošenjem ili hemijskim rastvaranjem stijena, ali mogu biti vulkanskog porijekla. Osnova podjele je prema veličini čestice i to: > 2mm – šljunak, 0.063 - 2 mm pijesak, 0.004 – 0.063 mm prah (silt), < 0.004mm glina. Prah i glina čine muljeviti materijal. Krupnije čestice talože se bliže obali.

- **Halmirogeni sedimenti** – nastali neposrednim taloženjem morskih soli. U dubokim morima nalazi se najfiniji mulj koji se naziva „crveni mulj “ ili „crvena glina“ i pokriva najveće dubine sva tri okeana. Ona je građena gotovo isključivo od silikata gvožđa i magnezijuma.

Abundanca bakterija u površinskim slojevima sedimenta je oko 2 do 1000 puta veća nego u okolnoj morskoj vodi. Razlog tome je veći sadržaj organske materije, sklonište od predatora. Distribuciju bakterija u moru u velikoj mjeri određuje sadržaj organske materije. Budući da bakterije u sedimentima razlažu organsku materiju i remobilišu nutrijente (azot i fosfor) u vodeni stub, utiču na biotu u ekosistemu a dijelom doprinose rastu primarnih producenata (algi) (Krstulović i Šolić, 2016; Choi i sar., 2016). Ostaci bentosnih organizama, sedimentirajući fitoplanktonski detritus kao i unos sa kopna i rijekama predstavljaju najvažnije izvore organske materije u sedimentima morskog ekosistema (Volkman i sar., 2000).

Procenat organske materije u sedimentima zavisi od veličine zrna čestica sedimenta. Što je veći udio sitnozrnih čestica veća je količina organske materije, jer ovaj tip čestica ima veću specifičnu površinu zrna i veću snagu adsorpcije. Ipak ova korelacija je više prisutna u dubokomorskim sedimentima. Količina organske materije je najveća u obalnim sedimentima nevezano za strukturu, jer se i do 46% primarne proizvodnje može naći u sedimentu. Pored toga obalni sedimenti predstavljaju dinamičan sistem koji je izložen djelovanju struja i talasa što utiče na resuspenziju sedimenta (Volkman i sar.2000; Krstulović i Šolić, 2006). Stoga promjene u sadržaju organske materije predstavljaju bitan mehanizam regulacije bakterijske brojnosti više nego veličinska frakcija sedimenta. Čak 95% bakterija u obalnim sedimentima živi pričvršćeno za čestice sedimenta. Distribucija bakterija u sedimentu zavisi od tipa i dubine sedimenta, hidrografskih osobina područja, strukture zrna, prostora između čestica, hemijskih osobina samih čestica, brzini njihove sedimentacije, kao i odnosa sa drugim članovima lanca ishrane u moru. Zrna čija površina nije glatka, već posjeduju tzv. hrapavost i neravnine pružaju mogućnost bijega od predatora i akumuliraju veći sadržaj organske materije. Sadržaj porne vode u međuprostoru čestica sedimenta takođe doprinosi raspodjeli bakterijske populacije. Poznato je da čestice pijeska i silta imaju veću permeabilnost što omogućava veći protok vode između čestica. Poznato je da frakcija krupnozrnih čestica dominira u površinskim slojevima sedimenta obalnog područja jer je zbog jakih struja i valova onemogućena sedimentacija sitnijih čestica (Krstulović i Šolić, 2006).

3.2 Organski polutanti u sedimentima

Organski polutanti – Persistent organic pollutants (POP) su po definiciji organska jedinjenja koja su veoma otporna na degradaciju u biološkom, fotolitičkom i hemijskom smislu. Najznačajnije podgrupe uključuju policiklična hidrokarbonska aromatična jedinjenja i halogena hidrokarbonska jedinjenja.

Hidrokarbonska jedinjenja se sastoje samo od ugljenika i vodonika. Neka hidrokarbonska jedinjenja male molekularne mase npr. metan, etan, etilen nalaze se u gasovitom stanju na optimalnoj temperaturi i pritisku. Posjeduju nisku polarnost stoga su slabo rastvorljivi u vodi ali se rastvaraju u organskim rastvaračima. Hidrokarbonska jedinjenja se dijele na 2 klase: 1. alkane, alkene i alkine (u obliku lanaca) 2. Aromatična hidrokarbonska jedinjenja (u obliku prstena).

Aromatični ugljovodonici razlikuju se u broju heksagonalnih prstenova u svojoj strukturi. Aromatični ugljovodonici mogu biti u tečnom ili čvrstom agregatnom stanju. Mnogo su reaktivniji od hidrokarbonskih jedinjenja u obliku lanaca. Glavni izvor hidrokarbonskih jedinjenja predstavlja prirodni gas u Zemljinoj kori, uglavnom ova fosilna goriva potiču od biljnih i životinjskih ostataka u ranijim geološkim dobima. Osim u geosferi nalaze se u atmosferi i u hidrosferi. Mogu nastati prirodnim ili antropogenim putem. Emisija PAH u atmosferu uključuje vulkanske erupcije i požare. Na urbanim i industrijskim lokalitetima emituju se ljudskom djelatnošću i formiraju se kao posljedica nepotpunog sagorijevanja ili pirolizom organske materije. Najveći izvori zagađenja hidrokarbonskim materijama potiču od izlivanja nafte brodovima i sagorijevanjem fosilnih goriva (Walker i sar., 2006; Ghosal i sar., 2016). Policklična aromatična jedinjenja se formiraju uvijek kada je organska supstanca izložena visokim temperaturama (Ghosal i sar., 2016). Dije se po postanku na: **petrogenične** koji su povezani sa naftom gdje naftalen kao komponenta dominira, **biogenične** koji su povezani sa biološkim procesima u ranim etapama nastanka morskog sedimenta kao što je perilen i **pirogeničnog** porijekla koji vode porijeklo od nepotpunog sagorijevanja fosilnih goriva, organskog materijala ili drveta i uglavnom dominiraju komponente sa 4-6 hidrokarbonskih prstenova (Bihari i sar., 2006; Louvado i sar., 2015; Duran i Cravo-Laureau, 2016).

Način na koji PAH ulazi u marinski ekosistem je ključno u determinisanju njihovog daljeg djelovanja i biodostupnosti u morskom ekosistemu. Bioraspoloživost pirogeničnih PAH komponenti je manja od petrogeničnih jer su čvršće vezane za čestice sedimenta (Cravo-Laureau i Duran, 2014).

16 PAH jedinjenja je prepoznato od strane EPA (eng. Environmental Protection Agency) kao prioritetni polutanti i to: naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benzo(a)antracen, krizen, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(g,h,i)-perilen i indeno(1,2,3-cd)piren (IARC, 2006; Hussar i sar., 2012). Vezivanje PAH komponenti za partikularnu materiju omogućava transport kroz vodu i vazduh i taloženje u zemljištu i sedimentima (Hussar i sar., 2012).

PAHovi sa nižom molekulskom težinom (sadrže dva ili tri aromatična prstena) se smatraju akutno toksičnim supstancama dok se PAHovi visoke molekularne težine (sadrže četiri ili više aromatičnih prstenova) smatraju genotoksičnim.

Poznato je da se PAHovi kovalentno vežu za DNK, RNK i proteine. Intermedijerni produkti nekih aromatičnih jedinjenja su toksičniji od njihovih izvornih oblika i vode do ozbiljnih celularnih oštećenja (Ghosal i sar., 2016)

Zajednice bentosnih organizama posebno su zavisne od kvaliteta morskih sedimenata jer se snadbjevaju hranljivim materijama sa dna. Pošto su bentosni organizmi hrana za žive organizme viših trofičkih nivoa, kvalitet sedimenta značajno utiče na lanac ishrane i cjelokupni ekosistem (Ghosal i sar., 2016).

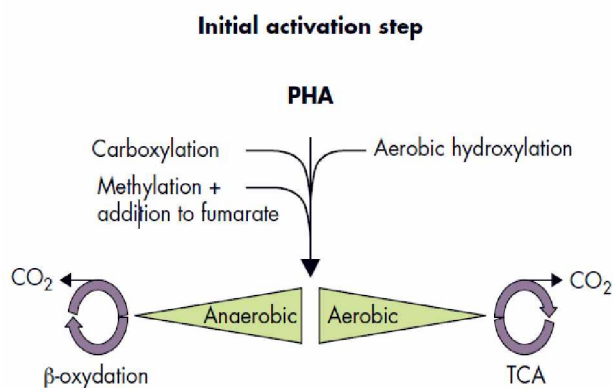
Organohlorna jedinjenja predstavljaju takođe nerazgradive toksične i mutagene komponente koji se lako apsorbuju na organske čestice u sedimentima vodenih ekosistema. Najpoznatija grupa su polihlorovani bifenili (PCB) koji se ne pojavljuju prirodno u okruženju. Sastoje se od bifenil strukture, dva povezana benzenova prstena u kojima su neki ili svi atomi vodonika zamjenjeni atomima hlora. Svi kongeneri PCB jedinjenja su lipofilni i njihova lipofilnost raste sa povećanjem stepena hlorisanja. Imaju izuzetnu stabilnost na toplotu, visok nivo hemijske inercije i otporni su na mnoge hemijske agense. Predstavljaju komercijalne stabilne viskozne tečnosti koji se koriste kao hidraulični fluidi u transformatorima, kao plastifikatori u bojenju, zatim u industriji gume, smole i papira. PCB 209 i PCB 120 su prisutni u komercijalnim proizvodima kao što je Aroclor 1254, Aroclor 1260 (IAEA, 2015).

Aktivnost mikroorganizama, kako aerobnih tako i anaerobnih, je jedini poznati proces degradacije PCB komponenti u sedimentu. Pod anaerobnim uslovima, reduktivna dehlorinacija PCB je prisutna u sedimentu. Aerobne bakterije brže rastu nego anaerobi i podržavaju visoku stopu degradacije rezultirajući mineralizacijom supstanci (Matturro i sar., 2016).

3.3 Razlaganje PAH jedinjenja u prirodi

Detoksikacija zagađenih lokacija podrazumjeva fizičke i hemijske tretmane uključujući izmuljivanje, iskopavanje, fotooksidaciju, dehlorinaciju, ekstrakciju rastvaračima (Spasojević, 2015). Mnogi od konvencionalnih tehnika ne utiču na kontaminante u potpunosti, čak omogućavaju njihov transfer iz jedne u drugu sredinu. Zbog toga za proces bioremedijacije postoji veliki naučni interes. Bioremedijacija (biodegradacija) je proces gdje se aktivnošću mikroorganizama organski polutanti konvertuju u manje štetne supstance. U praksi bioremedijacija je efektivna samo na mjestima gdje uslovi životne sredine omogućavaju rast mikroorganizama i ekspresiju odgovarajućih enzima.

Različiti abiotički i biotički faktori (temperatura, pH, sadržaj kiseonika, sadržaj nutrijenata, dostupnost polutanata) utiču na proces bioremedijacije (Ghosal i sar., 2016). Sa porastom temperature raste solubilonost PAHova. Međutim kako sa rastom temperature nivo kiseonika opada, u tom slučaju se smanjuje aktivnost aerobnih mezofilnih mikroorganizama. U većini istraživanja, biodegradacija se vrši pod uslovima optimalne temperature, budući da se na visokim temperaturama ova štetna jedinjenja mogu transformisati u još toksičnije proizvode. Mikroorganizmi zahtijevaju različite nutrijente kao što su azot, fosfor, kalijum i gvožđe za svoj razvoj. Stoga, dodatak nutrijenata može poboljšati proces bioremedijacije. Biodostupnost PAHova je jedan od ograničavajućih faktora bioremedijacije, budući da imaju tendenciju vezivanja za organsku materiju u sedimentu. Efikasnost biodegradacije takođe opada sa brojem aromatičnih prstenova. Dok se aerobni katabolizam aromatičnih supstanci izučavao decenijama, kapaciteti anaerobne degradacije nisu u potpunosti objašnjeni. U mnogo zagađenim sredinama dominiraju anoksični uslovi gdje se degradacija vrši uz pomoć anaeroba koristeći nitrate, sulfate i jone gvožđa kao finalne akceptore elektrona (Ghosal i sar., 2016). Glavni aktivacioni procesi PAH degradacije prikazani su na slici 1.



Slika 1. Glavni aktivacioni procesi PAH degradacije. Aerobni katabolizam uključuje hidroksilaciju prstena dioksigenazama. Anaerobni katabolizam uključuje metil transferazu za proces metilacije i glicil radikal enzime kao dodatke fumaratu, kao i karboksilaza za proces karboksilacije (Duran i Cravo-Laureau, 2016).

Degradacija naftalena kao strukturno najjednostavnijeg PAHa je široko dokumentovana od strane brojnih istraživača. U tu svhu koriste se *Pseudomonas* rodovi bakterija, zatim *Rhodococcus*, *Bacillus*. Bakterije *Sphingomonas*, *Sphingobium* fiziološki raznovrsna grupa unutar *Alphaproteobacteria* predstavljaju grupu sa širim opsegom razlaganja hidrokarbonskih jedinjenja veće molekulske mase.

Ghosal i sar. (2010) bilježe kompletnu degradaciju PAH molekula od strane Gram negativne bakterije *Ochrobactrum* dok isti autor 2013 god. dokumentuje asilimilaciju acenaftena i acenaftilena od strane *Acinetobacter* sp. *Mycobacterium* razgrađuje fluoranten, piren kao i benzo (a) piren (Spasojević, 2015; Ghosal i sar., 2016).

3.4 Razvoj metoda u mikrobnoj ekologiji

Robert Huk i Antoni van Levenhuk su prvi opisali neke od prokariotskih organizama u kasnom 17 vijeku. Sve do 80tih godina prošlog vijeka identifikacija mikroorganizama se zasnivala na uzgoju u čistoj kulturi. Međutim metodom uzgoja se ne uzima u obzir veliki dio mikrobiološke biomase i raznovrsnosti, što je postalo jasno vizualizacijom epifluorescentnim mikroskopom, metodama radioaktivnog obilježavanja kao i pojavom molekularnih metoda. Svega 1% mikrobiološke zajednice je moguće uzgojiti na standardnim podlogama što je poznato kao velika anomalija podloge. Jedan od razloga je nemogućnost predviđanja hranljivih sastojaka podloge nepoznatih mikroorganizama, a određene poznate podloge ne podržavaju rast nekih bakterija prilagođenih oligotrofnim uslovima (Munn, 2011).

Razvojem molekularnih metoda određivanja redosleda nukleotidne sekvence za male podjedinice ribosoma zajedno sa metodama fluorescentne hibridizacije po prvi put je omogućena identifikacija pojedinih bakterijskih grupa. Najpogodnija sekvenca ribozomalnih gena je 16S rRNA u određivanju strukture bakterijskih zajednica. Univerzalno je rasprostranjena u svim organizmima i sadrži konzervativne i varijabilne regione. Visoko konzervativni regioni su idealna mjesta i matrice prajmera u PCR tehnici pomoću kojih se konstruisani prajmeri vezuju za sekvence ispitivanih organizama. S druge strane specifičnost varijabilnih regiona omogućuje da se 16S rRNK koristi kao molekularni marker za identifikaciju određenih bakterija (Amman i sar., 1995; Boughner i sar, 2011).

Nukleotidno upoređivanje gena 16 S rRNK služi i kao evolucijski marker u klasifikaciji bakterijskih vrsta. Bakterijska 16S rRNK je odgovarajuće dužine, prosječno duga oko 1500 baznih parova (Boughner i sar., 2011). Sve metode koje se zasnivaju na lančanoj reakciji polimerazom zahtijevaju obavezan korak izolacije DNK iz uzorka i amplifikaciju željenog fragmenta DNK pomoću PCR-a (Polymerasa Chain Reaction) uz određene razlike detekcije amplifikovanog uzorka.

Od 2005 godine, napredak u tehnologiji sekvenciranja nove generacije (NGS) unosi revoluciju u biologiji a sasim tim i ekologiji mikroorganizama (Shokralla i sar.2002), sve više zamjenjujući konvencionalno sekvenciranje po Sangeru (Sanger i sar. 1997).

Paralelno dobijanje velikog broja nukleotidnih nizova (od nekoliko hiljada do nekoliko miliona nukleotidnih sekvenci po uzorku), konstantno poboljšanje tehnoloških platformi vodilo je boljem razumijevanju bakterijske raznolikosti koristeći tzv. pipeline softverske programe (QUIIME, mothur, SILVAngs). Od svog predstavljanja 2005g suočili su se sa izazovima kao što je: poboljšanje izlaznih sekvenci u pogledu dužine i tačnosti čitanja, drugo praktičnost i pristupačnost u pogledu cijene i na kraju amplifikacioni koraci koji vode ka određenim greškama i stvaranju himernih sekvenci. Iako se raspoložive NGS tehnologije baziraju na različitoj hemiji (Slika 2) zajednička su im dva glavna koraka: pripremanje biblioteke aplikona i detekcija inkorporirajućih nukleotida (Glenn 2011; Zhang i sar.2015; Shokralla i sar.2002). NGS tehnologije se klasifikuju u 2 kategorije: prva se bazira na PCR i podrazumjeva 4 raspoložive platforme: Roche 454 Genome Sequencer, Hi Seq 2000 Illumina, AB Solid TM Sistem i Ion Personal Genom Machine. Druga grupa SMS (Single Molekule Sequencig) ili pojedinačno sekvenciranje ne zahtjeva PCR kao primarni korak: HeliScop i PacBio RS SMRT Sistem (Shocralla i sar.2012). Pristupi sekvenciranja koji su našle najveću primjenu u morskoj mikrobnjoj ekologiji su 454 pirosekvenciranje – Roche 454 (Sogin i sar., 2006) i Illumina (Kozich i sar., 2013). Illuminom se za razliku od pirosekvenciranja dobija veći broj nukleotidnih sekvenci a pirosekvenciranjem veći broj baznih parova. Illumina sekvenciranje prethodno poznato kao Solexa prvi put se koristilo 2007 godine u analizi genoma. Danas su prisutna četiri tipa Illumina sekvenatora: HiSeq 2000, HiSeq 1000, Illumina GAIIx sa ukupnim protokom 600Gb, 300Gb, 95 Gb. Predstavljena MiSeq platforma proizvodi nukleotidne sekvence dužine 150bp sa protokom 1.5-2Gb. 2012g Illumina predstavlja novu platformu HiSeq 2500 kao poboljšanu verziju HiSeq 2000 platforme koja proizvodi 120Gb podataka za 27 sati (Shokralla i sar., 2012). Budući da sekvenciranjem nove generacije nije moguće dobiti cjelokupni nukleotidni redosled gena za 16S rRNA najčešće se koriste V1-V2, V3-V4 i V6 regija od ukupno devet varijabilnih regija (Vergin i sar., 2013, Korlević, 2015). Sve više studija se bave opisom, poređenjem, prednostima i unapređenjem tehnika sekvenciranja (Caporaso i sar., 2010, Degnan i Ochman, 2012, Klindworth i sar 2012, Mahe i sar., 2015, Oksenan i sar., 2019).

Edlund (2007) ispituje bakterijske zajednice duž gradijenta eutrofikacije i ukazuje da postoji veliki stepen statističke korelacije sa ukupnim organskim ugljenikom, nitratima, silikatima, kiseonikom. U obalnim području Hong Konga uticaj otpadnih voda je evidentan u istraživanjima Thiyagarajan i sar. (2010).

Bez obzira na znatnu redukciju zagađenja, nije uslijedio oporavak bakterijske zajednice koja je imala različitu kompoziciju od zajednice na lokacijama sa manjim stepenom zagađenja. Xiong i sar. (2011) konstatuju dominaciju taksona *Gammaproteobacteria* i *Deltaproteobacteria* u sedimentima istočnog Kineskog mora čija abundanca raste sa porastom zagađenja i unosom nutrijenata u ekosistem. U istraživanju Sun i sar. (2013) navodi se da prisustvo stresora u hronično kontaminiranim estuarima ne dozvoljava bakterijskim zajednicama oporavak kao što se detektuje u akutno kontaminiranim mjestima. To dovodi do promjene diverziteta i proliferacije tolerantnih vrsta. Tehnologijom sekvenciranja nove generacije Peng i sar (2015) istražuju zajednice u sedimentima nakon različitog vremena ekspozicije naftnom zagađenju. Ukazuju na promjenu bakterijskih zajednica tokom različitih faza izlaganja nafti.

Najveći broj istraživanja molekularnim metodama u Sredozemnom moru vršeno je u istočnom basenu, području Krita, Jonskom moru i dijelom u Tirenskom moru kao i u sjevernom Jadranu.

U istraživanjima Polymenakou i sar. 2005 ispituje se u kojoj mjeri hemijski i biološki parametri određuju distribuciju i diverzitet bakterijskih zajednica u sedimentima Termaikos zaliva koji je plići i produktivan u poređenju sa Jonskim morem, bazenom Krita i Levantinskim bazenom koji su dublji i oligotrofniji. Rezultati odvajaju zajednice dubokomorskih sedimenata ($> 1494\text{m}$) od plićih područja ($< 617\text{m}$) i produktivne vode od oligotrofnih voda. Naglašavaju da ukupan organski ugljenik utiče na distribuciju bakterijskih zajednica. Klonovi koji pripadaju *Gammaproteobacteriama* javljaju se mnogo češće u plićim sedimentima nego u dubljim sedimentima kakvo je južno Jonsko more.

Amer i Fatah (2014) opisuju hemijske karakteristike sedimenta El-Max distrikta (Aleksandrija) koji je industrijski centar okružen plitkim pješčanim plažama. Ističu da je najbrojnija ispitivana grupa *Proteobacteria* i rod *Pseudomonas* koji je detektovan na svim lokacijama. *Pseudomonas* je marinski izolat koji je najčešće obiježen kao bakterija koja razlaze hidrokarbonska jedinjenja. Vitali i sar. (2018) prate uticaj PAH jedinjenja poreklom iz različitih emisionih izvora na prokariotsku zajednicu u sedimentima tri Mediteranske luke.

Njihovo istraživanje pruža dokaz da PAH emisijski izvori imaju funkciju u oblikovanju strukture sulfat redukujućih bakterija. Rodriguez i sar. (2018) vrše eksperimente gdje prate efekte povećanja koncentracije organske materije i organskih polutanata na bakterijske zajednice.

Povećan sadržaj organske materije rezultirao je povećanom bakterijskom aktivnošću i diverzitetom dok je povećan sadržaj polutanata doprinio redukciji bakterijske aktivnosti i diverziteta. Istraživanja sedimenata u Jadranskom moru su prisutna ali u manjoj mjeri. Hemolitoautotrofna bakterija *Acidithiobacillus thiooxidans* (ranije poznatiji kao *Thiobacillus*) nađena u luci Ankone (Beolchini i sar., 2007) koristila se u eksperimentu bioremedijacije uklanjanja metala u manje toksične oblike. Nađena je i u istraživanjima Giovanelli i sar. (2013). Heterotrofne bakterije detektovane u Venecijanskoj laguni tačnije u sedimentu koriste sulfate i njihove okside kao donor elektrona redukujući ga do sulfida i H₂S. Za ove reakcije ključan enzim je DSR (sulfat reduktaza), evolutivno sačuvan, jedinstven za ovu grupu prokariota. Korlević i sar. (2015) u Sjevernom Jadranu ispituju diverzitet mikrobnih zajednica sekvenciranjem nove generacije na lokacijama koje su bile izložene dugotrajnom zagađenju zbog blizine industrijskih postrojenja. Najbrojnije klase su *Gammaproteobacteria* i *Alphaproteobacteria* čime je ukazano da su važne bakterijske grupe u razlaganju hidrokarbonskih jedinjenja. U pomenom istraživanju zajednice iz roda *Marinobacter* se navode kao potencijalni razlagači naftnih jedinjenja.

Quero i sar. (2015) ukazuju da se 32% varijacija brojnosti bakterijskih zajednica objašnjava PAH komponentom, i uočavaju značajnu korelaciju koncentracije PCB i *Chloroflexi* u oblasti Mar Piccolo Taranto – Italija i delte rijeke Po.

Paliaga i sar. (2019) istražuju uticaj industrijskih organskih polutanata na strukturu bakterijskih zajednica u sedimentima Valdibora zaliva (Sjeverni Jadran) gdje dominiraju *Gammaproteobacteria* i *Firmicutes*. Na lokacijama koje su pod uticajem zagađenja, autori navode prisustvo bakterija sposobnih da oksiduju sulfide do elementarnog sumpora. Di Cesare i sar. (2020) u istraživanjima zaliva Pule navode da najveći uticaj na strukturu bakterijskih zajednica imaju TOC i TN uprkos većoj koncentraciji teških metala.

Važno je napomenuti da nema podataka ovoga tipa na Crnogorskom primorju kao i da su podaci za Južni Jadran oskudni, tako da će ova studija postaviti osnovu daljeg istraživanja mikrobnih zajednica u sedimentima na području Crnogorskog primorja.

3.6 Metabolički procesi u sedimentima i karakteristični organizmi

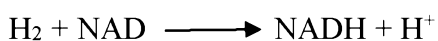
Aerobni heterotrofi podrazumjevaju široku paletu bakterija sposobnih da razlažu organsku materiju koristeći molekularni kiseonik kao elektron akceptor.

Samo par njih su obligatni aerobi a čak i za njih postoje alternativni načini preživljavanja pod anaerobnim uslovima. Takvi su *Bacillus* i *Pseudomonas* koji u posebnim uslovima koriste nitrata kao elektron akceptor.

Hemolitotrofi

Suprotno aerobnim heterotrofima hemolitotrofi (organizmi koji koriste neorganske energetske resurse) teže da budu specijalisti. Dijelev se na podgrupe:

Hidrogen oksidirajuće bakterije: Najrasprostranjeniji hemolitotrofi koji koriste molekularni hidrogen kao energetski resurs preko enzima hidrogenaze prema reakciji



Poznato je mnogo bakterija koje koriste hidrogen kao izvor energije od aeroba kao što su *Alcaligenes eutrophus*, preko fakultativnih organizama *Shewanella putrefaciens* do obligatno anaerobnih bakterija kao što su sulfat reducirajuće bakterije (SRB) i metanogeni. Neki od ovih organizama su autotrofi koji koriste CO₂ kao jedini izvor ugljenika.

Sumpor oksidirajuće bakterije: Bakterije litotrofi koji oksiduju sumporna jedinjenja su takođe specijalisti. Većina su autotrofni koristeći sumpor kao jedini izvor energije i CO₂ kao jedini izvor ugljenika. Sumpor oksidujuće bakterije prilagođene su nižim vrijednostima pH sredine (acidofili) kao i neutralnim vrijednostima. Ovdje spadaju *Thioploca*, *Thiotrix*, *Beggiatoa*

Gvožđe oksidirajuće bakterije: U neutralnim pH sredinama ulaze u kompeticiju za hemijsku oksidaciju dok na niskim vrijednostima pH gdje se dvovalentno gvožđe nalazi u većim količinama koriste ga kao jedini izvor energije npr. *Thiobacillus ferrooxidans*.

Nitrificirajuće bakterije i metanotrofi:

Nitrificirajuće bakterije obuhvataju dvije grupe: prvu koja oksidiše amonijak do nitrita i drugu koja oksidiše nitrite do nitrata. U prvu grupu spadaju *Nitrosobacter*, *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*. Posjeduju intracelularnu membranu i primarne amin oksidaze. U drugu grupu spadaju *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*.

Bakterije koje rastu na metanu kao jedinom izvoru ugljenika i energije zovu se metanotrofi i imaju sličnosti sa amonijak oksidirajućim bakterijama uključujući prisustvo intracelularne membrane, ekološki gledano dijele stanište i brojne su u oksično – anoksičnom prelazu

sedimenta. Metilotrofi koriste metanol kao izvor energije, mada heterotrofno rastu i na drugim karbonskim jedinjenjima.

Fermentišuće bakterije koriste širok spektar metaboličkih puteva u zavisnosti od dostupnosti organskog ugljenika. Dio ugljenika koji dolazi do ćelije se oksidiše a dio redukuje. Ovo rezultira ekskrecijom oksidišućih i redukujućih fermentativnih produkata (H_2 , CO_2 , acetat, laktat) koji su značajni u metabolizmu drugih organizama u anaerobnom lancu ishrane.

Nitrat-redukujuće bakterije. Velika grupa bakterija može katalizovati redukciju nitrata do azota u procesu denitrifikacije. Kada je količina kiseonika ograničena nitrati su sledeći najčešće korišćen elektron akceptor. Postoje velike varijacije između ovih organizama

Metal – redukujuće bakterije

Neke grupe bakterija sposobne su redukovati gvožđe ili mangan uz oksidaciju organske materije. Organizmi su klasifikovani u grupu fakultativnih anaeroba npr. *Shewanella* i obligatnih anaeroba blisko povezanih sa *Geobacter* bakterijama.

Sumpor i sulfat reducirajuće bakterije

Među sumpornim reducentima su fakultativni anaerobi kao što je *S. putrefaciens* i mnoge anaerobne bakterije u grupi *Wollinella*, *Desulfuromonas*. Sulfatni reducenti su obligatni anaerobi i uključuju *Desulfobacter*, *Desulfovibrio*.

Acetogene bakterije su taksonomski različite, detektovane u okviru mnogih rodova kao što su *Acetobacterium*, *Clostridium*, *Acetogenium*. To je heterogena grupa koja je u mogućnosti da katalizuje redukciju dva CO_2 molekula do acetata. Mnogi koriste hidrogen kao reduktant a i druga jedinjenja (Nealson, K.H, 1997; Munn, 2011).

3.7 Najbrojnije bakterijske grupe u sedimentima

Phylum *Proteobacteria*

Razdio (phylum) *Proteobacteria* je najveća i najraznovrsnija grupa bakterija u moru. Najveći broj obuhvata Gram negativne vrste sa spoljašnjom membranom uglavnom sastavljenom od lipopolisaharida. Pri kretanju koriste flagele, ali ima i nepokretnih obika kao i onih koji se pokreću tzv. klizanjem.

Obuhvataju metabolički različite tipove. Većina su fakultativni i obligatni anaerobi, hemolitoautotrofi i heterotrofi, mada ima i brojnih izuzetaka. Raznovrsni rodovi koji nisu među sobom povezani, pretvaraju energiju iz svetlosti kroz fotosintezu i anoksigenu

fotosintezu. Dije se na 5 klasa: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*. Najdominatniji morski predstavnici u sedimentima su *Gamma* i *Delta Proteobacteria* dok su *Alphaproteobacteria* prilično brojne. *Alphaproteobacteria* su najdominantnija grupa u moru na osnovu molekularnih analiza i javljaju se u većem broju u ekosistemima sa visokom produktivnošću. (Polymenakou i sar.2005). Neke grupe *Alphaproteobacteria* imaju sposobnost degradacije PAH kao što je fenantren, naftalen, piren (Edlund, 2007; Amer i Fattah, 2014). *Gamaproteobacteria* su najbrojnija grupa kada se analiziraju rezultati dobijeni metodom uzgoja i prisutni su u svakom tipu sedimenta kako u obalnim tako i u dubokomorskim sedimentima (Munn, 2011). Iako su većina hemorganotrofi, ova grupa uključuje nekoliko fototrofa i hemolitotrofa. Imaju značajnu ulogu u biodegradaciji i bioremedijaciji posebno rod *Pseudomonas* i *Marinobacter* (Amer i Fattah, 2014; Korlević i sar., 2015). Istraživanja pokazuju da su predstavnici *Gammaproteobacteria* najveći fiksatori ugljenika u obalnim sedimentima (Dyksma i sar., 2016). U klasu *Gammaproteobacteria* koja dominira obalnim sedimentima spada i familija *Enterobacteriaceae* koje su najpoznatije kao komensali i patogeni u crijevima toplokrvnih organizama. Uključuje rodove kao što su *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia* i *Enterobacter*. Oni su fakultativni anaerobi i Gram – štapićaste bakterije sa petritrihalnim flagelama, što ih razlikuje od isto tako gram – bakterija ove grupe kao što su *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*.

Phylum Acidobacteria

Razvojem molekularnih metoda poslednje dvije decenije phylum *Acidobacteria* prepoznat je kao najbrojnija grupa na Zemlji uglavnom u zemljištu i sedimentu predstavljajući i do 52% ukupne bakterijske zajednice (Sait i sar., 2002; Kielak i sar., 2016). Trenutno ovaj phylum broji 26 subgrupa koje se ekstremno razlikuju, pronađene i u uranijum kontaminiranim staništima (Barns i sar., 2007). Najveća grupa izolata kultivisana do danas pripada subdiviziji 1 (klasa *Acidobacteria*). Sve su heterotrofne, aerobne i mikroaerofilne vrste izuzev nekoliko vrsta koje su fakultativni anaerobi.

Većina *Acidobacteria* opisanih do danas su aerobi, sposobni rasti na 20% kiseonika(O₂) (vol/vol) a neki i u uslovima znatno sniženog kiseonika O₂ (1% ili 2% O₂) (Eichorstet i sar., 2011; Pankratov i sar., 2012). Takođe jedna grupa ovih bakterija pripada striktnim anaerobima uglavnom subgrupa 8 (*Geothrix fermentans* DSM14018, *Holophaga foetida*

TMBS4) i subgrupa 23 (*Thermoanaerobaculum aquaticum* MP-01). Wang i sar. (2018) u svojim istraživanjima navode grupe 10 i grupe 22 kao najbrojnije u morskom sedimentu. Na nivou razdjela (phylum) mnoge studije su pokazale da su *Acidobacteria* osjetljive na unos neorganskih i organskih nutrijenata (Cederlund i sar., 2014; Navarette i sar.2015). Neka istraživanja su pokazala toleranciju *Acidobacteria* na polutante kao što su PCB, hidrokarbonska jedinjenja, teški metali (Abed i sar., 2002; Paul i sar., 2006).

Phylum Bacteroidetes

Članovi ove grupe su heterotrofne gram negativne bakterije sa različitim morfološkim oblicima od malih kokoidnih oblika do velikih filamentoznih, različitih fizioloških tipova od obligatnih aeroba do obligatnih anaeroba. Sastoji se od 4 klase: *Cytophagia*, *Flavobacteria* *Bacteroidia*, *Sphingobacteria*.

Naseljavaju različita staništa hidrotermalne izvore, obalne sedimente, polarne sedimente, vodu i okeane. Prije svega su hemoorganotrofi, sposobni da razgrađuju različite biopolimere kao što su celuloza, hitin, pektin a ima i arobni vrsta. Produkcija hidrolitičkih enzima je ekološki jako značajna jer vrše degradaciju organske materije kao što je ćelijski zid fitoplanktona, egzoskelet rakova, rastvaranje fitodetritusa i partikularne organske materije. *Flavobacterium johnsoniae* i *Cytophagia hutchin* su *Bacteroidetes* sa sposobnošću razgradnje biopolimera u sedimentu.

Prirodno stanište phyluma *Bacteroidetes* su i crijeva sisara, često mogu biti prisutni u zagađenim akvatičnim sistemima i javljati se za vrijeme fitoplanktonskog cvjetanja (Kirchman, 2002).

3.8 Alfa i Beta diverzitet

Alfa diverzitet (α) – se odnosi na raznovrsnost unutar određene oblasti ili ekosistema, i obično je izražen brojem vrsta (tj. bogatstvom vrsta) u tom ekosistemu. Za analizu alfa diverziteta postoji nekoliko najčešće korišćenih indeksa koji variraju u zavisnosti od kvalitativnog bogatstva vrsta, njihove brojnosti i ravnomjernosti.

Brojnost različitih vrsta u određenoj zajednici unutar niše označava bogatstvo vrsta. Međutim, kao mjera diverziteta važna je i ravnomjernost gdje se upoređuje ujednačenost veličine populacije svake vrste. Ravnomjernost se još definiše kao mjera relativne abundance različitih vrsta u zajednici.

Uopšteno govoreći, kada je bogatstvo vrsta i ravnomjernost u porastu raste i diverzitet vrsta. Šenon - Viver i Simpsonov indeks se najčešće koriste kao mjera bakterijskog diverziteta bazirana na jedinici OTU (eng. Operational Taxonomic Unit). Šenon-Viver indeks se većim dijelom bazira na bogatstvu vrsta dok se Simpsonov indeks više bazira na ravnomjernosti. Kako da budemo sigurni da prikupljeni uzorci najbolje reprezentuju mikrobne zajednice određenog područja? Najjednostavniji metod procjene bogatstva vrsta je brojanje vrsta unutar zajednice. Međutim često je nemoguće izbrojati sve vrste unutar zajednice mikroorganizama. Dodatni problem je poređenje uzoraka različite veličine zajednica. Stoga, teško je odrediti odmah koja zajednica ima veći diverzitet kada se upoređuju uzorci različite veličine (Kim i sar., 2017). Jedan od načina da se prevaziđe ovaj problem je standardizacija svih uzoraka različitih zajednica do zajedničke veličine uzorka istog broja individua. Rarefrakcija je statistička metoda koja dozvoljava direktnu komparaciju uzoraka različite veličine. Rarefrakcijski metod zavisi od oblika krivulje abundantnosti vrste i stope otkrića više nego od apsolutnog broja vrsta u uzorku. Ova kriva (koja liči na mikrobnu krivulju rasta), u početku brzo raste gdje se svako čitanje kod obrade sekvenci identifikuje kao novi organizam (kao eksponencijalna faza mikrobnog rasta) i polako dostiže plato kako rijetke vrste ostaju u uzorku (stacionarna faza mikrobnog rasta). Ako rarefrakcijske krive dostižu plato, znači da su mikrobne zajednice prezentovane na pravi način. Rarefrakcijske krive pokazuju odnos OTU bogatstva vrsta i broja dobijenih sekvenci. Suprotno rarefrakciji, neparametrijski indeksi bogatstva vrsta ocjenjuju ukupno bogatstvo zajednice iz uzorka.

Chao1 je metod procjene broja vrsta u zajednici koju je odredila Ana Chao. Više se bazira na konceptu da rijetke vrste kreiraju sliku o tzv. nedostajućim vrstama koje su neodređene u uzorku. Zbog toga se Chao indeks više koristi pri određivanju manje abundantnih vrsta (Kim i sar., 2017).

ACE (Abundance based coverage estimator) je metod procjene brojnosti vrsta koristeći tzv. pokrivenost uzorka. Uzima u obzir i abundantne i rijetke vrste. Vrste koje imaju preko 10 individua u uzorku se smatraju abundantnima dok se vrste sa manje od 10 individua smatraju rijetkima. Međutim tačna frekventnost abundantnih vrsta nije obuhvaćena ovim indeksom dok se frekventnost rijetkih vrsta može tačno utvrditi (Hughes i sar., 2001).

Ako ispituje promjene u raznovrsnosti vrsta između ekosistema, onda mjerimo beta diverzitet. Specifičnost jednog ekosistema, razlike u odnosu na drugi ekosistem, postaju očigledne tek pri upoređivanju njihovih struktura.

4.MATERIJAL I METODE

4.1 Područje istraživanja

Crnogorska obala obuhvata uski pojas kopna koji se proteže od Debelog Brijega na sjeverozapadu do Rijeke Bojane na jugoistoku. Dužina obale iznosi 294km od čega 105.7km pripada Boki Kotorskoj. Na sjeveru i sjevero-istoku, Crnogorska obala je okružena planinama Orjen, Lovćen, Sutorman i Rumija. (Regner, 2001). Istraživanje se odvijalo u Bokokotorskom zalivu, Budvanskoj rivijeri i Barsko-Ulcinjnskom području.

4.1.1 Bokokotorski zaliv

Savicki (1912) i Milojević (1953) ističu da se ovo područje najvjerojatnije formiralo kombinovanim uticajem tektonskih sila i fluvijalne erozije. Radjičić (2005) objašnjava da je zaliv postao u pliocenu kao i sva kraška polja denudacijom i flišnom fluvijalnom erozijom. Strme padine Lovćena i Orjena stvaraju dominantan okvir zaliva.

Boka Kotorska se nalazi u jugoistočnom dijelu Jadranskog mora i predstavlja poluzatvoren bazen sa specifičnim hidrografskim i geomorfološkim osobinama. Zaliv se sastoji od tri bazena (Kotorsko-Risanski, Tivatski i Hercegnovski zaliv) povezanih preko dva uska tjesnaca (Kumbor i Verige širine oko 350m) sa ukupnom dužinom obale oko 106km, ukupnom površinom od 84km² i maksimalnom dubinom od 64m (Bortoluzzi i sar., 2016).

4.1.2 Batimetrijske karakteristike i morsko dno

Glavna batimetrijska karakteristika svih zaliva je povećanje dubine prema centralnoj zoni i izobate veće dubine se približavaju obali. npr. izobate od 20m prati konfiguraciju obalne linije na udaljenosti 200-300m osim u istočnom dijelu Tivatskog zaliva i zapadnom dijelu Hercegnovskog zaliva. Takav vertikalni profil zaliva omogućava jasnu stratifikaciju specifičnih okeanografskih parametara i stvaranje termoklina i pinoklina u određenim sezonama tokom godine. Maksimalna dubina od 64m zabilježena je jugoistočno od Perasta.

Prosječne i maksimalne dubine zaliva predstavljene su u Tabeli 1.

Tabela 1. Prosječne i maksimalne dubine po zalivima (Mandić, 2001)

	Prosječna dubina (m)	Maksimalna dubina (m)
Boka Kotorska (u cjelini)	27.6	64
Kotorski zaliv	26	64
Risanski zaliv	25.7	36
Tivatski zaliv	25.5	46
Herceg Novski zaliv	31	60

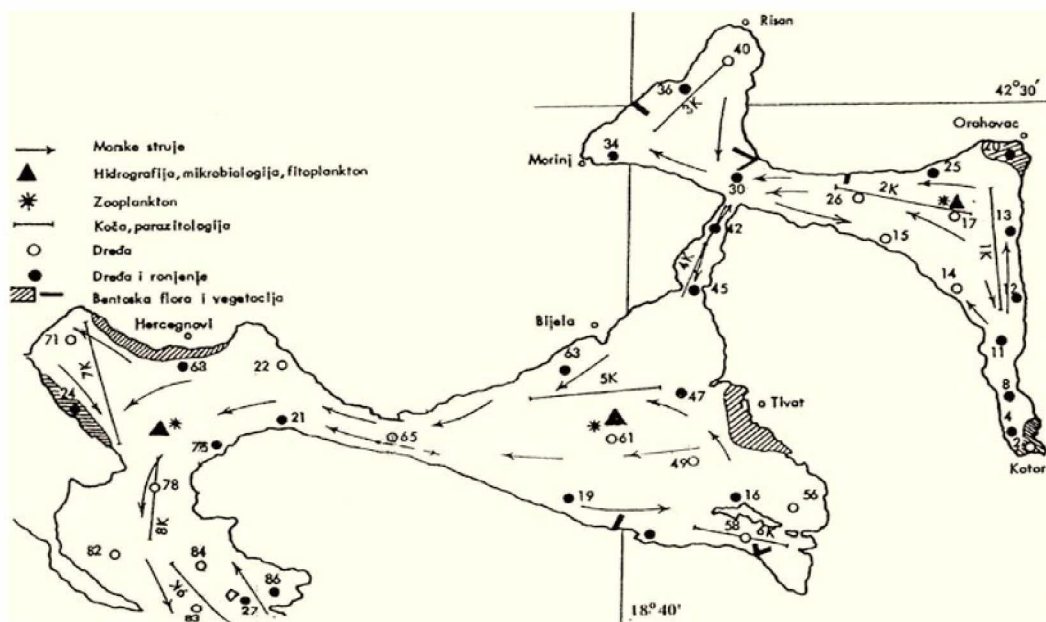
Priliv slatke vode u zaliv potiče od kraških polja Lovćena i Orjena. Dotok slatke vode u Zaliv omogućen je velikim brojem vrela, podzemnih izvora, potoka i rijeka koje su najčešće aktivne tokom kasne jeseni, zime i ranog proljeća (Mandić, 2001). Godišnji priliv slatke vode se procjenjuje približno oko 15-18m³/s mada varira od 3-4m³/s do 180-200 m³/s. Neposredno iznad Risanskog zaliva je područje sa najobilnijim padavinama u Evropi (Crkvice, 4.742 mm). Naime prema dostupnim podacima, procjenjuje se da je godišnji dotok otpadnih voda u ovo područje 5x10m³ što je oko 0.2% ukupne vodene mase Bokokotorskog zaliva. Takva hidrometeorološka situacija, nameće potrebu postavljanja glavnih odvoda otpadnih voda dalje od obale, iz Bokokotorskog zaliva na otvoreno more (Mandić i sar., 2001).

Morsko dno Kotorsko-Risanskog zaliva je glinovitog sastava dok se pjeskovito-glinovita struktura dna nalazi kod grada Risna. Glina dominira i u Tivatskom zalivu a osim gline prisutan je i glinasto-ilovasti pijesak dok je u Hercegnovskom zalivu morsko dno prekriveno glinastim pijeskom (Lepetić, 1965; Gvozdenović, 2020). Centralni dijelovi pojedinih zaliva pokriveni su finim terigenim muljem sa detritusnim elementima. Podvodni grebeni i vrtače naročito su prisutni u unutrašnjem dijelu Zaliva i to na relaciji od Orahovca do Perasta i od Risna do Morinja. Grebeni se takođe nalaze na ulazu u Kotorski zaliv - Verige a između ovih grebena pojavljuje se muljeviti tip sedimenta (Karaman-Brida, 1970, Gvozdenović, 2020).

4.1.3 Strujanja u Bokokotorskom zalivu

Strujanje vodenih masa u Bokokotorskom zalivu je prilično neravnomjerno i zavisi uglavnom od struja i slobodnih oscilacija tzv. seši. (Mandić i sar. 2001). Vjetar kao i miješanje slane i slatke vode ima veliki uticaj na pravac i intenzitet struja u Zalivu. Intenzivna cirkulacija i razmjena vodenih masa prisutna je većinom u površinskim slojevima do 5m

dubine i za vrijeme maksimalnih dotoka slatke vode. Cirkulacija u dubljim slojevima uglavnom je rezultat plimnih strujanja, uzrokujući slabu razmjenu vodenih masa kroz zaliv. U ljetnjem periodu, intenzitet cirkulacije je izrazito nizak, a to se posebno odnosi na periferne djelove (Luka kotor, Dobrota, Risan, Krtole, Topla) dok je u jesenjem periodu ulazna struja jača i ima sjeverozapadni pravac (Slika 3).



Slika 3 Cirkulacija morske vode u Bokokotorskom zalivu – (Mandić, S. 2001)

S druge strane vjetrovi, njihov pravac i intenzitet, imaju značajan uticaj na cirkulaciju morske vode. Dakle, visok procenat "mirmih dana" bez vjetra sa jedne strane i velika učestalost vjetrova koji duvaju prema obali sa druge strane, i tzv. odlazna struja znatno smanjuju intenzitet cirkulacije i prečišćavanja (purifikacije) morske vode u zalivu. Ovi fenomeni zapravo pritiskaju površinski sloj vode ka obali tako stvaraju nepovoljne uslove za ispuštanje otpadnih voda.

Ovo je posebno primjetno u ljetnjem periodu u Tivatskom zalivu. Dolazna struja koja se kreće u pravcu sjeverozapada ljeti je jača. Od maja do oktobra, prisutna je vertikalna cirkulacija prilično primjetna u unutrašnjem dijelu Bokokotorskog zaliva. Ove struje podižu naslage detritusa i nutritivnih soli sa dna što utiče na produktivnost u Zalivu.

U Kotorskom i Risanskom zalivu prisutne su jake turbulentne struje koje su jače sa većim prilivom slatke vode (Stjepčević i Parenzan, 1980; Mandić i sar., 2016).

4.1.4 Ispitivano područje van zaliva

Uprkos činjenici da je rijeka Bojana relativno kratka (40km), hidrološki režim je relativno složen i zavisi od niza prirodnih i antropogenih faktora. Glavni prirodni faktori povezani su sa hidrološkim režimom Skadarskog jezera i njenih pritoka, pogotovo rijeke Drim (Petković i Sekulić, 2018). Kako je rijeka Drim donosila velike količine nanosa, kanal rijeke Bojane je pretrpio značajna pogoršanja i redukciju poprečnog presjeka. Proučavanje hidrološkog i morfološkog režima rijeke Bojane postaje sve značajnije tokom vremena zbog njenog velikog uticaja na morski ekosistem. Ovo se posebno odnosi na Deltu (tzv. Adu Bojanu), ostrvo koje se formiralo taloženjem sedimenta koje je vjekovima rijeka Bojana donosila u Jadransko more. Ekološka održivost ovog ostrva, koje je postalo jedno od glavnih turističkih atrakcija u Crnoj Gori, direktno je zavisno od "snadbijevanja" sedimentom rijeke Bojane. Jedna strana ostrva izlazi na more i čini preko 3km dugu plažu a druge dvije su okružene sa dva rukavca Bojane. Ostrvo Ada u smjeru riječnog toka dugo je oko 2.8km i visoko 3-4m, 13km kopnenim putem jugoistočno od Ulcinja (Dabović, 2007; Petković, 2018). Izgrađeno je od rastresitog priobalnog materijala: pijesak, glina, šljunak.

Rijeka Bojana izvire iz Skadarskog jezera, a po količini vode koju unosi u more treća na Mediteran (poslije Nila i rijeke Po u Italiji). Dno korita rijeke Bojane nalazi se ispod nivoa mora na dužini od 36m uzvodno (Petković, 2018).



Slika 4. Morsko riječno ostrvo Ada

<https://www.dreamstime.com/aerial-view-river-bojana-ada-island-monte-montenegro-image104676694>Ada Bojana

Povšina akvatorijuma Luke Budva, na poziciji između Staroga grada i naselja Dukley marine, obuhvata 52 444 m². Ima ukupno 580 vezova, a od toga 280 komunalnih i 300 komercijalnih. Luka može prihvatiti jahte i brodove maksimalne dužine do 70m i maksimalnog gaza 5.5m. Dubina mora na plovnom putu je između 7-8m, a idući prema obali, dubine postepeno padaju. Luka Budva, jednom godišnje angažuje ovlašćena lica radi izrade karte izobata (dubina) i u skladu sa tim organizuje produbljivanje morskog dna. Morsko dno je muljevitog tipa.

Ne postoji mogućnost za dobijanje dozvole za izgradnju dodatnog objekta za smještanje spremnika za prihvatanja zauljanih tečnosti i otpadnih voda sa plovila. Ovi tankovi (polietilenski po standardu) su u skladu sa bezbjedonosim procedurama smješteni na krovu upravne zgrade što je opet jedna vrsta improvizacije. U dokumentu Morskog dobra koji se bavi informacijama o stanju u Luci Budva a datira iz 2017g, iz kojeg je preuzet prethodni opis akvatorijuma, navodi da je Luci Budva neophodno proširenje sa novom infrastrukturom.

Marina Bar je pozicionirana u blizini gradskog jezgra i smještena na samom ulazu u Jadran sa 500 komercijalnih vezova od čega je 30 vezova određeno za megajahte duže od 24m. Takođe posjeduje 200 nekomercijalnih vezova za čamce. Dužina operativne obale od 550m sa dubinom mora od 14m određen je kao prostor za skladištenje ruda, starog željeza, koksa, boksita. Na izdvojenim petrolejskim vezovima, dubine 14m vrši se prihvati i otprema nafte i naftnih derivata. Takođe postoji kapacitet skladišta od 4500tona namijenjena za robu različitih namjena voća, povrća i žitarica (www.gov.me).

Del Bianco i sar. (2015) opisuju dva morfološka dijela morskog dna u oblasti luke Bar i to: tzv. polje sedimentnih talasa i oblast izduženih grebena. U oblasti sedimentnih talasa dno je pokriveno ilovastim muljem i muljevitom glinom.

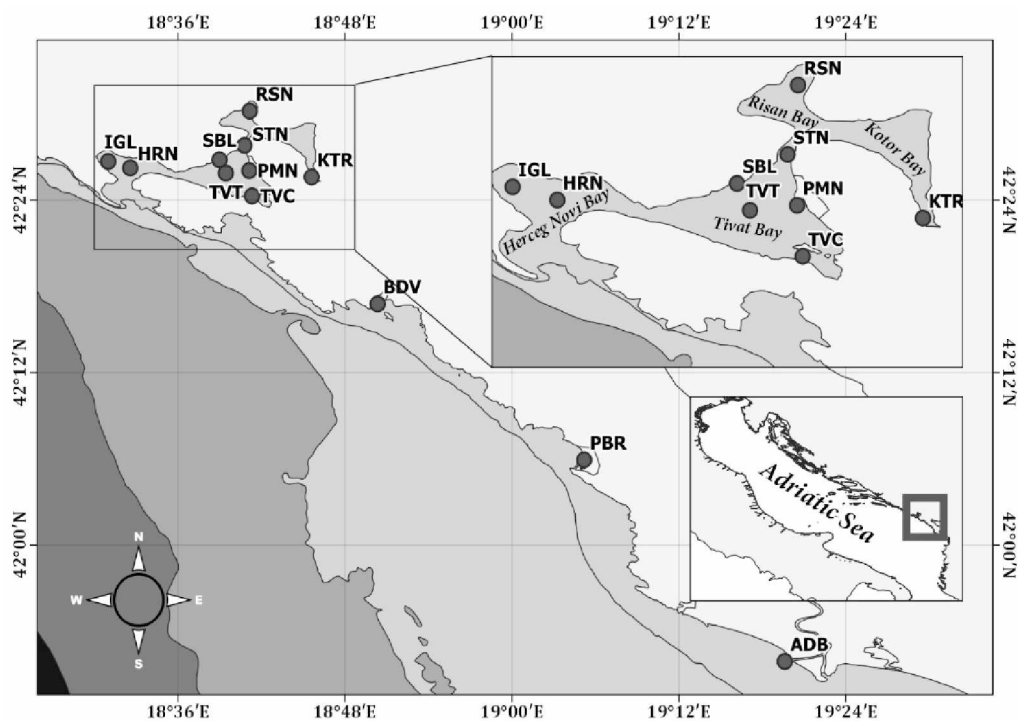
Uprava pomorske sigurnosti u dokumentu iz 2017g. navodi da zagađenje sa brodova može biti fizičko, hemijsko i biološko. Fizičko zagađenje nastaje ispuštanjem voda visoke temperature iz brodskih postrojenja što ima za posledicu povećanje temperature mora uz ubrzanje metaboličkih i bioemijskih procesa kao i potrošnje kiseonika. Deficit kiseonika narušava balans i fiziološku ravnotežu živog svijeta u moru uz stvaranje uslova za razvoj mikroorganizama. Hemijsko zagađenje nastaje ispuštanjem nafte, uljanog otpada, škodljivih tečnih supstanci, fekalnog otpada i medicinskog otpada sa brodova. Biološko zagađenje nastaje rasijavanjem bakterija, virusa i insekata sa brodova.

4.2 Metodologija istraživanja

Metodologija istraživanja predstavlja kombinaciju terenskog rada (uzorkovanje sedimenata na odabranim lokalitetima), laboratorijskog rada (analiza bakterijskih i hemijskih parametara) kao i rada na statističkoj analizi dobijenih rezultata i poređenju sa podacima iz literature.

4.2.1 Uzorkovanje i odabrane lokacije

Uzorkovanje površinskih uzoraka sedimenta vršilo se Ponarovim grabilom u septembru 2015g na 12 lokacija na Crnogorskom primorju prema proceduri UNEP, MED POL (2006). Uzorci sedimenta čuvali su se na -70°C do obrade. Odabrani lokaliteti prikazani su na slici 5 a njihov značaj prikazan je u tabeli 2.



Slika 5. Mapa odabranih lokaliteta

Tabela 2. Značaj odabranih lokaliteta

Uzorak	Naziv lokaliteta i dubina (m)	Karakteristike lokaliteta
1	Luka Kotor (15m)	Unutrašnji dio Bokokotorskog zaliva, lokacija blizu jezgra Staroga grada Kotora. Veliki uticaj slatkih voda rijeke Škurde, izvora Gurdić. Opterećenje otpadnim vodama posebno u ljetnjem periodu usled slabog strujanja morske vode, otpadnih voda. Sve veći broj kruzera i razvoj pomorskog turizma. Rizik od izlivanja nafte. 2015g povećan broj kruzera za 33% u odnosu na 2010g.
2	Risan (22m)	Pod velikim uticajem slatke vode – vrelo Sopot i Morinj. Usled povećanog dotoka organske materije podložan eutrofikaciji. Problem nepročišćenih otpadnih voda.
3	Sveta Nedelja (36m)	Uski prolaz Bokokotorskog zaliva. Opasnost zagadjenja usled sve većih pomorskih aktivnosti
4	Porto Monetengro (15m)	Tivatski zaliv, središnji dio Boke Kotorske. Na mjestu nekadašnjeg brodogradilišta Arsenal, sada velika marina jahti i turističko naselje. Opasnost od fekalnog otpada sa jahti. Rizik od zagadjenja PAH I PCB.
5	Tivat centar (38m)	Kao posledica urbanizacije, turizma i saobraćaja Tivatski zaliv pod antropogenim uticajem. Na obalnom području zaliva postoji više ispusta kojom se nepročišćene vode ispustaju u more. Uticaj marine Porto Montenegro i Brodogradilišta Bijela
6	Tivat Uvala (Uvala Krtole) (12m)	Najbliži dio Tivatskog zaliva. Prisutna dva uzgajališta mušulja, obogaćivanje nutrijentima. Uticaj rijeka Široka i Gradišnica koje su sezonskog karaktera.
7	Brodogradilište Bijela (26m)	Najveće brodogradilište u Južnom Jadranu, pozicionirano u urbanom dijelu naselja Bijela. Problem grita. Jedna od crnih ekoloških tačaka u Crnoj Gori, unos različitih zagadivača u more PAH, PCB, teški metali
8	Herceg Novi centar (40m)	Spoljašnji dio Bokokotorskog zaliva. Nedostatak kanalizacionog kolektora. Antrpogeni uticaj ali bliže otvorenom moru za razliku od Tivatskog zaliva.
9	Igalo (10m)	Uticaj rijeke Sutorine. Nedostatak kanalizacionog kolektora, povećani unos hranljivih soli i organske materije. Mineralne vode Slatine pozicionirani u jugo-zapadnom dijelu aluvijalne ravnice Igalo.
10	Budva (10m)	Marina jahti, 580 vezova, u blizini Staroga grada Budva, glavne turističke destinacije u Crnoj Gori
11	Luka Bar (12m)	Glavna luka Crne Gore (komercijalni, teretni brodovi) u blizini centra grada Bara. Kapacitet luke je 500 vezova komercijalnih brodova i 200 teretnih brodova. Najveći rizik predstavlja rukovanje teretom, izlivanje nafte iz pogonskih tankova.
12	Ada Bojana (10m)	Estuarno područje. Uticaj rijeke Bojane, druge po veličini pritoke Jadranskog mora.

4.2.2 Analiza hemijskih i granulometrijskih parametara

Hemijske analize vršene su u Centru za ekotoksikološka ispitivanja u Podgorici. Granulometrijska analiza izvršena je u Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu. Analiza je izvršena laser difrakcijom shodno veličini čestice LS 13320 analizatorom (Beckman-Coulter, USA). Sediment je klasifikovan prema Šepardovoj klasifikacionoj šemi (1954).

4.2.2.1 PAH i PCB jedinjenja

Analiza PAH i PCB uzoraka vršena je u skladu sa standardima EPA 8270, 1996. Uzorci sedimenta su isušeni u liofilizatoru, samljeveni i homogenizovani. Ekstrakcija uzorka se vrši u Soxhlet ekstraktoru uz dodatak internih standarda. Ekstrakcija traje 16-18h i vrši se smješom rastvarača heksan:dihlormetan = 1:1. Nakon završene ekstrakcije uzorak se uparava na rotacionom vakuum uparivaču i prečišćava na tzv. Clean up koloni. Za prečišćavanje se koristi neutralni Silica Gel 60mesh za PAH jedinjenja i kombinacija kiselog i baznog Silica Gela za PCB pri čemu se kolona kondicionira heksanom. Procedura sumpor prečišćavanja se vrši u skladu sa EPA, 3660B. Eluiranje željenih komponenti se vrši smješom heksan : dihlormetan = 1:1 za PAH komponente i heksan za PCB komponente. Ovako prečišćeni uzorak se uparava na odgovarajuću zapreminu u tečnom azotu, zatim prečišćava od sumpora prema EPA, 3660B. Analiza se vršila na gasnom hromatografu sa masenim spektrometrom GC-MS 2010 QP plus, Shimadzu na koloni Supleco SLB 5ms, dužina 30 m, id 0.25mm, debljina faze: 0.25 μ m. Retenciona vremena prikazana su u tabeli 3. Ispitivane komponente PAH jedinjenja su: naftalen (Napht), acenaftilen (Aceph), acenaften (Ace), fluoren (Fl), fenantren (Phen), antracen (Ant), fluoranten (Flu), piren (Pyr), benzo [a] antracen (BaA), krizen (Chr), benzo [a] piren (BaP), benzo [b] fluoranten (BkF), indeno [1,2,3] piren (InP), benzo [g,h,i] perilen (BgP) i dibenzo [a,h] antracen (DBgP). Ispitivane komponente PCB su: PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180.

Tabela 3. Mase i retenciona vremena komponenata

Komponenta	Masa 1 (m/z)	Masa 2 (m/z)	Masa 3 (m/z)	RT
Naftalen	128	127	129	8.113
Acenaftilen	152	151	152	11.87
Acenaften	153	154	152	12.297
Fluoren	166	165	163	13.543
Fenantren	178	176	152	15.813
Antracen	178	176	152	15.933
Fluoranten	202	200	203	18.653
Piren	202	200	203	19.17
Benzo (a) antracen	228	226	229	22.083
Krizen	228	226	229	22.157
Benzo (b) fluoranten	252	250	253	24.483
Benzo (k) fluoranten	252	250	253	24.543
Benzo (a) piren	252	250	253	25.133
Indeno (123-cd) piren	276	277	138	27.413
Dibenzo (a,h) antracen	278	279		27.503
Benzo (g,h,i) perilen	276	277	138	28.003
Interni standardi				
Naftalen-D8	136	137		8.067
Acenaften D10	162	164		12.22
Fenantren-D10	188	189		15.753
Fluoranten-D10	212	210		18.61
Krizen D12	240	236		22.083
Perilen D12	264	260		25.253

4.2.2.2 PAH deskriptori

Stepen zagađanja PAH jedinjenjima se klasifikuje kao: nizak < 0.1mg/kg, umjeren 0.1-1 mg/kg, visok 1-5 mg/kg i veoma visok > 5mg/kg (Baumard i sar., 1998). Ispitali smo četiri različita PAH odnosa prema Yunker i sar. (2002): (i) za Ant/Ant+Phen odnos, dobijene vrijednosti < 0.10 upućuju na kontaminaciju petrogeničnog porijekla dok vrijednosti > 0.10 upućuju na procese sagorijevanja; (ii) za BaA/BaA+Chr odnos, dobijene vrijednosti < 0.20 upućuju na unos nafte, vrijednosti > 0.35 upućuju na izvore sagorijevanja a vrijednosti između 0.20 i 0.35 upućuju na kombinovan uticaj; (iii) za Flu/Flu + Pyr odnos, za dobijene vrijednosti < 0.40 PAH komponente su petrogeničnog porijekla, vrijednosti između 0.40 i 0.50 iniciraju sagorijevanje tečnih fosilnih goriva ili sirove nafte, dok vrijednosti > 0.50 ukazuju da su PAH komponente nastale sagorijevanjem drveta, trave ili uglja. Proračunat je zbir četiri PAH komponente male molekulske težine - Σ LPAH (Phen, Ant, Flu, Pyr) i zbir osam komponenti velike molekulske težine Σ HPAH

(BaA, Chr, BbF, BkF, BaP, Inp, BgP, DBA) u skladu sa Soclo i sar. (2000). Ako je $\Sigma\text{LPAH}/\Sigma\text{HPAH} < 1$ porijeklo PAH je pirogenično dok $\Sigma\text{LPAH}/\Sigma\text{HPAH} > 1$ ukazuje na petrogenično porijeklo.

4.2.2.3 Određivanje ukupnog organskog ugljenika

Određivanje ukupnog organskog ugljenika (TOC) u čvrstim uzorcima vršeno je prema metodi (DIN EN 13137) računanjem razlike sadržaja ukupnog ugljenika (TC) i neorganskog ugljenika (IC). Analiza je vršena instrumentom TOC 5000A sa modulom SSM 5000A koji služi za analizu čvrstih uzoraka. Modul ima dva ulaza, TC i IC. Za TC mjerenje uzorak je vagan u keramičkoj posudici i unešen u reaktor za sagorijevanje gdje katalizator (sadrži kobalt oksid i platinu na aluminijumskim kuglicama) omogućuje potpuno prevođenje ukupnog ugljenika u CO₂. Temperatura sagorijevanja je 900°C. Nastali CO₂ se prenosi do detektora u glavnom dijelu instrumenta. Za IC mjerenje uzorak se takođe vaga u keramičkoj posudici i postavlja u IC ulaz. Po zatvaranju ulaza u uzorak se pipetira 25% fosforna kiselina i odmah unosi u reaktor zagrijan na 200°C. Reakcijom sa fosfornom kiselinom karbonati i hidrogen karbonati se prevode u CO₂, koji se prenosi u detektor.

Kalibracija TC raspona (raspon 30) je vršena pomoću glukoze visoke čistoće. Sadržaj ugljenika u glukozu je 40%. Natrijum karbonat je korišćen za kalibraciju neorganskog ugljenika. Sadržaj ugljenika u natrijum karbonatu je 11,33%. Gas nosač je čisti kiseonik, pritisak je bio 3 bara a protok 0,5 l/min.

4.2.2.4 Određivanje ukupnog fosfora

Određivanje ukupnog fosfora je vršeno prema metodi EPA 3051A. Procedura zahtjeva digestiju 0.5g uzorka homogenizovanog sedimenta osušenog u liofilizatoru sa 10ml HNO₃ (9ml) u mikrotalasnoj pećnici (Speedwave MWS-4, Berghof, Germany) na 175°C oko 5min. Proizvodi digestije su nakon hlađenja filtrirani, centrifugirani na 2,000 – 3,000 rpm 10min i razblaženi do finalne zapremine koristeći destilovanu vodu. Uzorci su analizirani pomoću spektrometra sa indukovano-spregnutom plazmom (Icap 6300, Thermo, USA).

4.2.2.5 Određivanje ukupnog azota

Ukupni azot u uzorcima sedimenta analizira se Kjeltex 2300 analizatorom (Foss tecator, Danska) sa blok sistemom za mineralizaciju prema proceduri (Persson i sar., 2008). Procedura pripreme uzoraka zahtjeva sušenje u liofilizatoru i jedan ili više ciklusa homogenizacije.

Veličina čestica trebala bi biti manja od 1mm mada za homogenizovane uzorke veličina čestica nije presudna. Za digestiju 1g sedimenta koristi se 12ml koncentrovane H_2SO_4 i so-katalizator 7g (tzv. 2 Kjeltabs Cu/3.5). Temperatura na kojoj se vrši digestija je 420°C 45-60 minuta. Digestijom se raskidaju azotne veze i nastaju amonijum joni. Nakon hlađenja produkti digestije se razblažuju dodatkom 30ml destilovane vode. Destilacija traje 4minuta. Zatim se uzorku dodaje 25ml sumporne kiseline ($c = 0.05\text{mol/L}$) i par kapi Tashiro indikatora (mješavina metilen plavo i metilen crveno).

U alkalnom dijelu analizatora za titraciju se koristi 45ml 45% (w/w) natrijum hidroksida ($c = 0.1\text{ mol/L}$). Blank titracija se vrši sa 10ml sumporne kiseline ($c = 0.05\text{mol/L}$), 10ml vode i par kapi Tashiro indikatora. Titracija se vrši natrijum hidroksidom do obezbojavanja. Buduci da je poznata koncentracija titranta ($c=0.05\text{ mol/L}$) i sumporne kiseline dodate uzorku ($c = 0.1\text{ mol/L}$), zapremina natrijum hidroksida potrebna za titraciju uzorka odgovara višku sumporne kiseline u rastvoru. Da bi izračunali azot u uzorku potrebno je izračunati količinu sumporne kiseline koja reaguje sa amonijakom i stvara amonijum sulfat

4.2.2.6 Određivanje amonijaka

Amonijak se analizira prema proceduri ISO/TS 14256-1:2003. Homogenizovani vlažni uzorak sedimenta se voreteksira 1 sat sa rastvorom kalijum hlorida ($c = 2\text{mol/L}$) na sobnoj temperaturi u odnosu 1:5. Rastvor se filtrira i analizira na spektrometru UV-1800 (Shimadzu, Japan).

4.3 Mikrobiološka analiza

4.3.1 Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK iz uzorka vrši se pomoću PowerSoil DNK Isolation Kita po uputstvu proizvođača (Mobio Laboratories, USA).

1. Izvagati 0.5g uzorka sedimenta i dodati u tubicu. Voreteksirati. Pripremljena tubica proizvođača sadrži rastvor koji pomaže disperziju čestica sedimenta, pomažu rastvaranje humidne kiseline i štiti nukleinsku kiselinu od degradacije.

2. Dodati 60 μl rastvora obilježen kao C_1 po uputstvu proizvođača. Ovaj rastvor sadrži SDS i druge disruptivne agense. SDS je anjonski deterdžent koji pomaže raskidanju masnih kiselina i lipida koji su povezani sa membranskom ćelijom. Ukoliko dođe do precipitacije

rastvora C₁ mora se ugrijati do 60°C prije upotrebe. Vorteksirati 10 minuta i centrifugirati 30 sekundi na 10,000xg.

3. Prebaciti supernatant u čistu tubicu. Očekuje se od 400 - 500µl supernatanta u ovom koraku i još uvijek sadrži čestice sedimenta. Dodati 250µl rastvora C₂ i vorteksirati 5 sekundi. Inkubirati na 4°C 5min. Centrifugirati 1min na 10,000xg. Rastvor C₂ je patentiran od strane IRT (Inhibitor Removal Tehnology). Sadrži reagens koji pomaže precipitaciju organskih molekula (koji nisu DNK) i neorganskih čestica uključujući proteine i ćelijske ostatke koje ostaju u talogu nakon centrifugiranja. Važno je ukloniti organske i neorganske ostatke jer bi mogli uticati na čistoću DNK.

4. Prebaciti 600µl supernatanta u čistu tubicu. Dodati 200µl rastvora C₃. Inkubirati na 4°C 5minuta. Rastvor C₃ je patentiran od strane IRT (Inhibitor Removal Tehnology) i sledeći je reagens koji potpomaže dodatnoj precipitaciji organskih (koje ne pripadaju DNK) i neorganskih čestica. Centrifugirati 1minut na 10,000xg.

5. Prebaciti 750µl supernatanta u čistu tubicu. Promućkati reagens C₄ prije upotrebe. Dodati 1.200µl ovog reagensa u supernatant i vorteksirati 5 sekundi. Reagens C₄ sadrži veliku koncentraciju soli i omogućava vezivanje DNA na silika membrani filter tubice.

6. Usuti 675 µl supernatanta u tubice sa filterom na vrhu i centrifugirati 1minut na 10,000x g na sobnoj temperaturi. Odbaciti tečnost koja je prošla kroz filter, dodati ponovo 675 µl supernatanta i centrifugirati 1minut na 10,000x g. Preostali supernatant dodati i centrifugirati po prethodnom postupku. DNK je ostala na silika membrani filtera dok su nečistoće prošle kroz membranu.

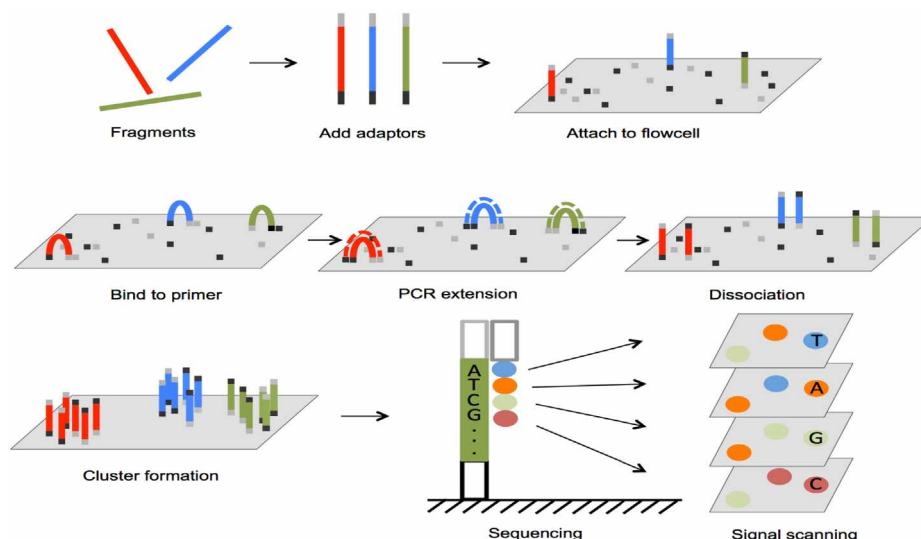
7. Dodati 500µl reagensa C₅ i centrifugirati na sobnoj temperaturi 30 sec na 10,000xg. Reagens C₅ je tzv. ispirajući reagens na bazi etanola koji će dodatno pročititi DNK vezanu za membranu filter tubice. Tečnost koja je prošla kroz filtere odbaciti.

8. Prebaciti filter u čistu tubicu. Dodati 100µl reagensa elucionog reagensa C₆ koji će osloboditi DNK sa filtera. Takođe se može koristiti sterilna DNK-PCR voda (sterile free DNK-PCR Grade Water). Rastvor C₆ ne sadrži EDTA. Centrifugirati 30 sec na 10,000xg. Odbaciti filtere i DNK u tubici je spremna za dalju obradu. C₆ reagens sadrži (10mM TRIS). Čuva se na temperaturi od - 20 °C do - 80°C.

4.3.2 Illumina sekvenciranje

Kvantitet i kvalitet DNK analizirani su koristeći spektrofotometar NanoDrop (ND 2000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Hipervarijabilni region V4/V5 bakterijske 16SrRNA amplifikovan je koristeći prajmere 515F i 926R. PCR smješa volumena 50 µl sadržavala je finalne koncentracije 1X Phusion GC pufera, 200µM dNTP, 0.5µM uzvodnog i nizvodnog prajmera (početnice) i 1U Phusion DNK polimeraze (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase; New England BioLabs, Inc.). Program je obuhvatao preddenaturaciju 30 s na 98°C, 30 ciklusa koji su se sastojali od: denaturacije 10 s na 98°C, sparivanja prajmera 30 s na 62°C, produžavanja lanca 30 s na 72°C i na kraju konačnim produženjem lanca 5 min na 72°C. PCR produkti su pročišćeni i dalje sekvencirani koristeći Illumina MiSeq platformu u Laboratoriji Kaiserslautern u Njemačkoj.

Proces Illumina sekvenciranja teče na sledeći način: DNK koja se sekvencira se fragmentiše u kraće lance od oko 200bp (baznih parova). Adapteri se vežu za krajeve fragmenata DNK koji se hibridizuju na površini protočne ćelije. Svaka protočna ćelija je podjeljena na pet odvojenih linija. Illumina ili sekvenciranje sintezom (SBS) koristi specifičnu most amplifikaciju (bridge amplification) koja se odigrava na protočnoj ćeliji. Nakon PCR umnožavanja svaki hibridizovani dio DNK je umnožen formirajući grupe (clusters) sa oko 1000 kopija originalnog molekula. Sve kopije se sekvenciraju zajedno, svaka grupa je snadbjevena sa DNK polimerazom, prajmerima i četiri fluorescentno obilježena nukleotida terminatora (A, C, G, T) koji se aktiviraju laserom. Signal se detektuje kamerom gdje svaka od terminator baza ima drugačiju boju i pokazuje koja se baza inkorporirala. Po uklanjanju jedne terminator fluorescentne baze dodaje se sledeća i proces se nastavlja dok oko milion grupa ne bude sekvencirano. Ova platforma je najviše korišćena u okviru NGS tehnologija (Mardis, 2008; Shokralla, 2012).



Slika 6. Illumina dijagram

4.3.3 Bioinformatičke analize

Sekvenciranjem 16S rDNK, dobijaju se tzv. sirova čitanja koja se često preklapaju i sadrže kontaminacije. Obrada bioinformatičkim alatima omogućava tzv. čišćenje (Jandhyala i sar., 2015).

Spojeni krajevi sekvenci su odstranjeni koristeći *bbduk* funkciju i spojeni koristeći *bbmerge* funkciju *BBMap* paketa (v.38.71; <https://sourceforge.net/projects/bbmap>). Spojena očitavanja ponovo su filtrirana koristeći *QIIME* v.1.8.0 (Caporaso i sar., 2010). Zadržane su sekvence sa tačno utvrđenim barkodovima, prajmerima, nukleotidima i minimum dužine 250baznih parova.

Provjera himera je potvrđena koristeći *UCHIME* (Edgar i sar., 2011). Nehimerične sekvence su grupisane pomoću *SWARM* v3.0.0 (Mahé i sar., 2015) sa zadatim postavkama u operativne taksonomske jedinice OTU (eng. Operational Taxonomic Unit). Vršilo se poređenje sa *SILVA* bazom podataka (*SILVA* release 132 Decembar 13, 2017) koristeći *blastn* (*BLAST* verzija 2.9.0; Altschul i sar., 1990). Singletoni i dabltoni (sekvence sa jednim ili dva ponavljanja), OTU klasifikovani kao hloroplastna DNK nisu uzeti u obzir. Dobijeni OTU filtrirani su po kvalitetu koji zadovoljava $\geq 98\%$ identiteta nukleotida. Standardizacija između uzoraka izvršena je nasumičnim biranjem OTU tabele do minimum 18, 057 čitanja koristeći *rrarefy* funkciju *R* *vegan* paketa (Oksenan et al., 2019) kako bi se greške svele na minimum i omogućilo poređenje između uzoraka.

PICRUSt2 (verzija 2.3.0 beta; Douglas i sar., 2020) je bioinformatički alat korišten za procjenu funkcionalnog sastava mikrobioma bakterijskih zajednica tako što predviđa grupe gena i njihovu učestalost u svakom uzorku sedimenta. OTU Tabela je normalizovana u PICRUSt2 sa daljim analizama izvršenih na genetskom - KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes ortolog, KO) i metaboličkom nivou (MetaCyc) kako bi se odredilo da li je diverzitet ispitanih mikrobnih zajednica u skladu sa njihovim metaboličkim i funkcionalnim sposobnostima. Funkcionalne kategorije uključuju predviđanje gena za degradaciju aromatičnih komponenti, policikličnih aromatičnih hidrokarbonskih jedinjenja, hloralkana, hloralkena, naftalena, aminobenzoate i veliku porodicu membranskih proteina – ABC transportera.

4.3.4 Statističke analize

Sve statističke analize su izvršene u R programu verzija 4.0.0 (R Core Team, 2020) koristeći više paketa. Određen je alfa diverzitet bakterijskih zajednica računajući OTU bogatstvo zajednica, Šenon indeks, Simpson indeks, non parametrijski ACE, Chao indeks i indeks pokrivenosti.

Beta diverzitet mikrobnih zajednica na nivou OTU određen je koristeći Bray-Curtis analizu sličnosti i grupisani na osnovu Ward hijerarhijske metode (Ward.d2; Murtagh i Legendre, 2014). Razlike između bakterijskih grupa na nivou svih OTU potvrđene su PERMANOVA analizom (Permutational multivariate analysis of variance). Bakterijska distribucija na nivou porodice hijerarhijski je grupisana pomoću Bray-Curtis analize sličnosti. Spermanova korelaciona analiza izvršena je da bi prikazala linearnu povezanost između bakterijskih zajednica i faktora spoljašnje sredine.

Za razmatranje odnosa između lokaliteta kao i povezanosti mikrobnih zajednica i abiotičkih faktora korišćena je kanonijska korespodentna analiza (CCA) i to na nivou svih OTU kao i na nivou gena. Rezultati CCA analize prikazani su koristeći ggplot2 (Wickham, 2016). Razlike između učestalosti gena povezanih sa metabolizmom degradacije kao i razlike učestalosti gena povezanih sa ABC transporterima između selektovanih grupa uzoraka potvrđeni su ANOVA sa HSD Tukey testom.

Grupisanje ispitanih lokacija na osnovu hemijskih parametara vršeno je pomoću PCA (Principal component analysis) i prikazano kao korelacioni biplot. Faktori spoljašnje sredine prikazani su kao vektori. Duži vektori i vektori koji formiraju manji ugao sa ordinacijskim osama su jako korelisani sa tom osom. Za grafički prikaz hemijskih parametara korišćen je Ocean Data View 4 (Schlitzer, 2010).

5. REZULTATI

5.1 Granulometrijska i hemijska karakterizacije sedimenta

Granulometrijska analiza pokazuje dominaciju muljevitih frakcija u svim uzorcima sedimenta Boke Kotorske, varirajući od 66% do 82%. Glinovita frakcija je varirala od 8% do 36%. Prema Šepard klasifikaciji, sediment je definisan kao muljeviti, glinoviti i pjeskoviti. Na lokacijama izvan zaliva BDV i PBR, granulometrijska analiza pokazuje uglavnom glinovitu i pjeskovitu frakciju, dok na lokaciji ADB (92%) dominira pjeskoviti sediment (Tabela 4).

Tabela 4. Granulometrijska kompozicija uzoraka sedimenta. Sediment je definisan prema Šepardovoj klasifikacionoj šemi (1954)

	Glina (%)	Mulj (%)	Pijesak (%)	Šepard klasifikacija
KTR	31.5	66.1	2.4	Glinoviti mulj
RSN	15.1	68.5	16.5	Pjeskoviti mulj
STN	19.6	72.1	8.3	Glinoviti mulj
PMN	7.7	65.7	26.7	Pjeskoviti mulj
TVC	12.7	78.3	9	Mulj
TVT	27.5	68.2	4.3	Glinoviti mulj
SBL	26.1	68.2	5.7	Glinoviti mulj
HRN	11.4	79	9.6	Mulj
IGL	11.5	81.7	6.8	Mulj
BDV	8.6	54.7	36.8	Pjeskoviti mulj
PBR	5.5	44.7	49.8	Muljeviti pijesak
ADB	1.1	6.6	92.3	Pijesak

Stepen zagađenja policikličnim aromatičnim ugljovodonicima klasifikovan je shodno Baumard i sar. (1998). Rezultati su pokazali da se lokacija ADB odlikuje niskim stepenom zagađenja, 6 uzoraka sedimenta su pokazala umjeren stepen zagađenja na pozicijama: RSN, TVC, TVT, HRN, IGL i BDV. Na lokacijama KTR, STN i BDV registrovan je visok stepen zagađenja PAH jedinjenjima dok je na pozicijama SBL i PMN detektovan veoma visok stepen zagađenja.

Maksimalna vrijednost ukupnog PAH sadržaja od 15.6 mg/kg izmjerena je na lokalitetu SBL u središnjem dijelu Bokokotorskog zaliva. Druga značajno visoka vrijednost od 8.41mg/kg izmjerena je na lokaciji PMN. Najniža vrijednost 0.04mg/kg detektovana je na lokaciji ADB, zatim slijedi lokacija IGL sa izmjerenom PAH koncentracijom od 0.30mg/kg (Prilog, Slika I i Slika II).

Klasifikacija PAH vrijednosti vršena je takođe prema OSPAR (2009) Direktivi gdje se u obzir uzimaju BAC (Background Assessment Concentrations) i ERL vrijednosti (Effects Range Low). Koncentracije ispod BAC vrijednosti predstavljaju rezultate odličnog statusa, koncentracije u rasponu između BAC i ERL vrijednosti mogu se smatrati dobrim rezultatom dok se vrijednosti iznad ERL odnose na nezadovoljavajući status životne sredine. PAH komponente sa 2-6 hidrokarbonskih prstenova čije vrijednosti prelaze ERL vrijednosti detektovani su u središnjem dijelu Bokokotorskog zaliva na pozicijama SBL i PMN, dok na poziciji KTR vrijednosti za fenantren, fluoranten, benzo (a) antracen i benzo (g,h,i) perilen prelaze dozvoljene vrijednosti. Na poziciji STN, koncentracija benzo (g,h,i) perilen prelazi ERL dozvoljene vrijednosti. Pozicija ADB sa pjeskovitim sedimentom predstavlja najmanje zagađenu poziciju (Prilog, tabela I).

Vrijednosti količnika $\Sigma\text{LPAH}/\Sigma\text{HPAH}$ na ispitanim lokacijama variraju od 0.42 do 0.90 i upućuju na pirolitičko porijeklo (Tabela 5).

Vrijednosti $\text{Ant}/\text{Ant}+\text{Phe}$ i $\text{BaA}/\text{BaA}+\text{Chr}$ variraju od 0.13 do 0.5 odnosno 0.47 do 0.53 ukazujući da su procesi sagorijevanja dominantni. Vrijednosti $\text{InP}/\text{InP}+\text{BgP}$ variraju između 0.48 do 0.52 inicirajući da procesi sagorijevanja tečnih fosilnih goriva i sirove nafte preovladavaju na lokaciji KTR, RSN, STN, IGL, BDV, PBR, dok procesi sagorijevanja putem uglja ili drveta dominiraju na lokaciji PMN, TVC, TVT, SBL, HRN i ADB. Shodno vrijednostima indeksa $\text{Flu}/\text{Flu}+\text{Pyr}$ čije se vrijednosti kreću od 0.5 do 0.56 preovladavaju procesi sagorijevanja drveta, trave ili uglja.

Tabela 5. PAH deskriptori

	Ant/Ant+Phen	BaA/BaA+Chr	Flu/Flu+Pyr	InP/InP+BgP	$\Sigma\text{LPAH}/\Sigma\text{HPAH}$
KTR	0.198	0.543	0.537	0.494	0.730
RSN	0.211	0.500	0.537	0.485	0.570
STN	0.178	0.518	0.542	0.467	0.591
PMN	0.187	0.528	0.554	0.515	0.740
TVC	0.145	0.500	0.531	0.507	0.614
TVT	0.186	0.500	0.544	0.503	0.600
SBL	0.152	0.536	0.562	0.525	0.900
HRN	0.159	0.523	0.533	0.508	0.600
IGL	0.160	0.500	0.552	0.489	0.564
BDV	0.180	0.516	0.548	0.483	0.800
PBR	0.134	0.478	0.544	0.486	0.420
ADB	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500

Ukupna PCB koncentracija je varirala od 0.001mg/kg do 0.830mg/kg gdje je maksimum zabilježen na lokaciji SBL (Prilog. Slika III i IV). U Tabeli I (prilog) su prikazane propisane vrijednosti PCB komponenata. PCB 52, PCB 101, PCB 118, PCB 138, PCB 153, PCB 180 prelaze dozvoljene ERL vrijednosti na pozicijama PMN i SBL dok je vrijednost PCB 118 povećana na poziciji KTR i takođe nije u skladu sa propisanim vrijednostima.

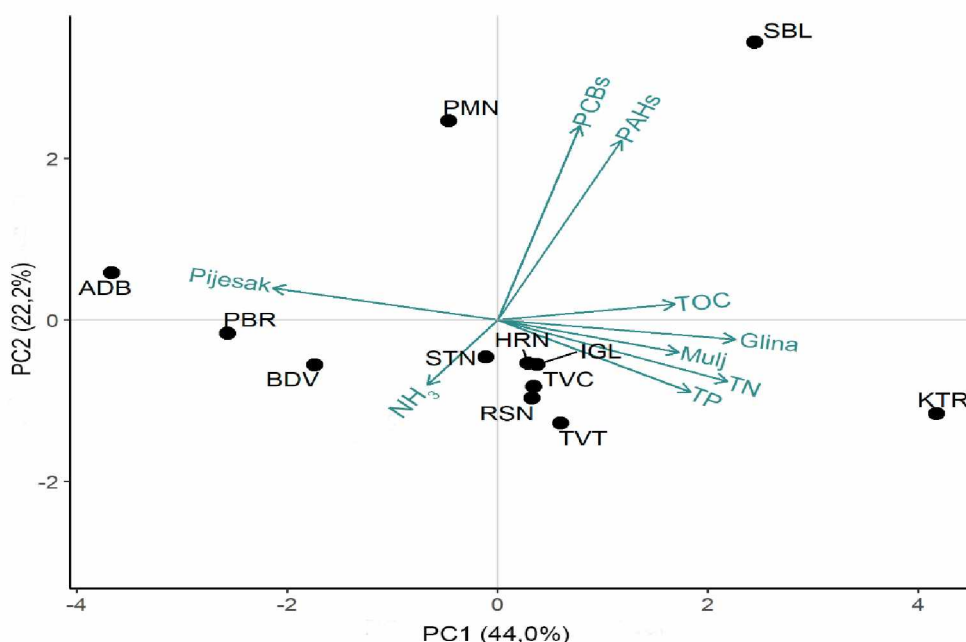
Vrijednosti ukupnog ugljenika TOC u površinskim slojevima sedimenta variraju od 7700mg/kg do 24 900mg/kg (Slika V i VI). Najveće vrijednosti su zabilježene na poziciji KTR u unutrašnjem dijelu Bokotorskog zaliva dok je minimum zabilježen u Risanskom zalivu na lokaciji RSN. Kategorizacija US EPA (2002) se odnosi na procjenu uticaja sadržaja ukupnog ugljenika u sedimentu i prema tome vrijednosti ispod 10 000 mg/kg (1%) se smatraju niskim uticajem, vrijednosti od 10000mg/kg do 30000mg/kg (1-3%) podrazumjevaju srednji uticaj dok rezultati iznad 30 000mg/kg (3%) se odnose na visok uticaj. U ovom istraživanju zabilježen je niski i srednji uticaj TOC na istraživane sedimente. Rezultati ukupnog azota se kreću u rasponu od 303mg/kg do 1697mg/kg gdje je maksimalna vrijednost zabilježena na lokaciji KTR (Slika VII i VIII). Varijacije TOC/TN odnosa u sedimentima pokazuju da li organski ugljenik ima zemljišno ili algalno porijeklo. Ako je odnos ukupnog ugljenika i azota veći od 15 porijeklo je zemljišno, ako je ovaj odnos manji od 10 organska materija ukazuje na algalno porijeklo, dok vrijednosti između 10 i 15 znače kombinovano porijeklo (Gälman i sar.2008)

Na pozicijama KTR, TVT, HRN, BDV i ADB organska materija ima kombinovane izvore sa odnosom C/N od 10 do 14. Na pozicijama RSN, TVC i PBR odnos C/N < 10 ukazuje na algalno porijeklo dok organska materija u sedimentima STN, PMN, SBL i IGL sa odnosom C/N većim od 15 ukazuje na zemljišno porijeklo. TOC/TN indeks varira od 6.41 na lokaciji RSN do 22 na lokaciji STN. (Slika IX i X).

Koncentracija amonijaka varira od 8.8mg/kg do 70.8mg/kg. Najmanja koncentracija zabilježena je na poziciji IGL a maksimalna na lokalitetu TVT, najdubljijoj tački Tivatskog zaliva. Takođe vrijednost od 70.3 mg/kg izmjerena je na lokaciji BDV izvan zaliva (Slika XI i XII).

Ukupan fosfor je varirao od 273mg/kg na lokaciji PMN do 838mg/kg na lokaciji KTR (Slika XIII i XIV). TOC/TP indeks varira od 3.57 do 81.5 (Slika XV i XVII). Minimalne vrijednosti su izmjerene na lokaciji PBR a maksimalne vrijednosti izmjerene su na lokaciji ADB.

Metoda glavnih komponenti (PCA) primjenjena je na rezultatima hemijskih i granulometrijskih parametara (PAH, PCB, TN, TP, TOC, NH₃) gdje su se izdvojila 2 faktora koja opisuju površinski sloj sedimenta. Analiza pokazuje da je 66.2% ukupne varijabilnosti opisano faktorima PC1 (44.0%), PC2 (22.2%). Prema faktoru PC1 izdvojili su se TP, TN, TOC, pjeskoviti, muljeviti i glinoviti sadržaj. Manji uticaj na PC1 koordinatu imaju PAH, PCB i amonijak. Prema PC2 faktoru izdvaja se veći uticaj PAH, PCB i pjeskovita struktura sedimenta.



Slika 7. PCA analiza hemijskih i granulometrijskih parametara sedimenta

Lokacija središnjeg dijela Bokokotorskog zaliva SBL se odvaja u odnosu na PAH i PCB komponente. Zatim se izdvaja lokacija KTR u odnosu na TOC, TN, TP, glinoviti i muljeviti sadržaj sedimenta. Lokacije ADB, PBR, BDV se grupišu zajedno na osnovu većeg pjeskovitog sadržaja sedimenta, dok na grupisanje lokacije STN manji uticaj ima amonijak.

5.2 Mikrobiološka karakterizacija sedimenta

5.2.1 Rezultati dobijeni Illumina sekvenciranjem

Illumina sekvenciranjem dobijeno je 371 692 validnih sekvenci i 10 130 OTU (Operational Taxonomic Unit). Prosječna dužina nukleotidnih sekvenci iznosila je 300 baznih parova. U tabeli 6 predstavljeni su podaci o broju dobijenih sekvenci u toku Illumina sekvenciranja.

Tabela 6. Podaci o broju dobijenih sekvenci

Oznaka uzorka	Broj sekvenci prije čišćenja (eng.raw reads)	Boj sekvenci poslije čišćenja (eng.clean reads)	Procenat dobijenih sekvenci	Broj sekvenci po uzorku u finalnoj OTU tablici
KTR	120324	71320	53.27%	31824
RSN	95939	59079	55.90%	27089
STN	125597	76787	55.18%	39463
PMN	122148	85145	63.89%	53216
TVC	103660	67063	59.50%	29877
TVT	82706	55468	60.79%	21095
SBL	78459	47069	55.37%	18057
HRN	93356	58957	57.37%	28086
IGL	100255	66794	61.64%	33023
BDV	115861	73294	58.21%	35614
PBR	105637	67381	58.90%	31757
ADB	101177	64258	58.26%	27066

5.2.2 Alfa i Beta diverzitet ispitanih bakterijskih zajednica

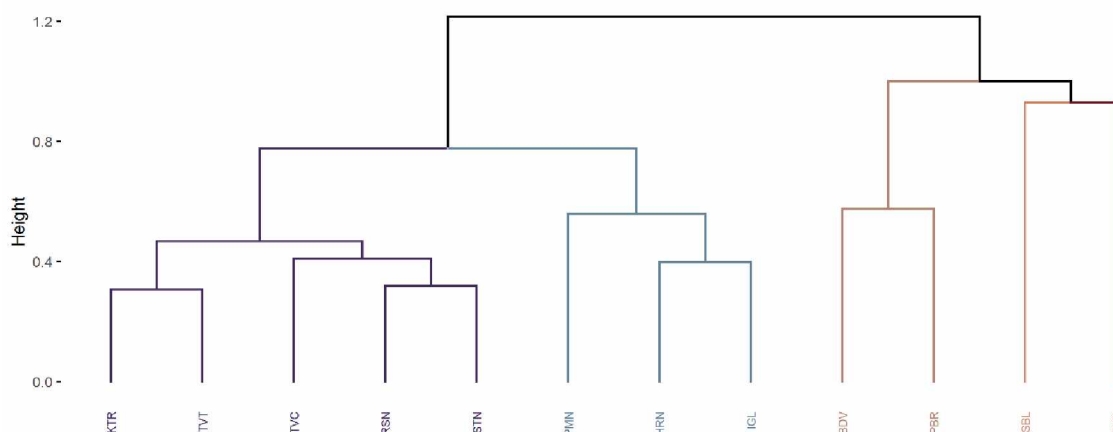
Prikaz bogatstva OTU zajednica, Šenonov i Simpsonov indeks, neparametrijski indeksi (Chao i ACE) kao i indeks pokrivenosti (eng. Good's coverage) prikazani su u Tabeli 7. Na TVC lokaciji zabilježene su najveće vrijednosti diverziteta (3021), zatim slijedi lokacija HRN (2995) i KTR (2917).

SBL lokacija pokazuje najmanje vrijednosti bogatstva vrsta (1652) a zatim slijedi lokacija ADB (1881). Neparametrijski indeksi pokazuju najveće vrijednosti na TVC poziciji (Ace = 3812; Chao1 = 4659) dok uzorci sa lokacije SBL pokazuju najmanje vrijednosti (Ace = 1851; Chao1= 2125). Najveće vrijednosti bakterijskog diverziteta u sedimentu (Šenon indeks = 6.500) su zabilježene na lokaciji PBR a zatim HRN (Šenon indeks = 6.455) dok je najmanja vrijednosti zabilježena na lokaciji SBL (Šenon indeks = 5.418). Simpsonov indeks varira od 0.971 (SBL) do 0.994 (PBR). Indeks pokrivenosti pokazuje vrijednosti između 92.3% do 97.5%.

Tabela 7. Prikaz Alfa diverziteta baziran na bogatstvu zajednica, Šenon indeksu, Simpson indeksu, ACE, Chao1 i pokrivenosti

	Bogatsvo vrsta	Šenon indeks	Simpson indeks	ACE	Chao1	Pokrivenost (%)
KTR	2917	6.333	0.985	3526.9	4085.6	93.38
RSN	2796	6.049	0.983	3516.6	4232.0	92.94
STN	2692	5.990	0.980	3415.7	4133.7	93.08
PMN	2847	6.222	0.990	3549.2	4133.2	92.97
TVC	3021	6.138	0.983	3812.3	4658.6	92.27
TVT	2800	6.197	0.982	3439.6	4006.0	93.38
SBL	1652	5.418	0.971	1851.3	2124.9	97.18
HRN	2995	6.455	0.993	3700.0	4344.2	92.76
IGL	2728	6.207	0.991	3429.5	4110.9	93.08
BDV	2353	5.946	0.984	2766.1	3127.1	95.13
PBR	2862	6.525	0.994	3438.2	4022.0	93.58
ADB	1881	6.143	0.986	2032.2	2180.5	97.52

Beta diverzitet analiziran na osnovu Ward dendrogram analize i Bray Curtis indeksa na nivou svih OTU zajednica identifikuje pet grupa (Slika 8). Bakterijske grupe na pozicijama TVT, KTR, RSN, STN, TVC (unutrašnji i središnji dio Bokokotorskog zaliva) čine prvu grupu, drugu grupu čine lokacije: IGL, HRN, PMN (spoljašnji dio Bokokotorskog zaliva i Porto Montenegro), treću grupu čine lokacije: BDV i PBR (spoljašnji dio Bokokotorskog zaliva). Posebno se izdvajaju SBL (najzagađenija lokacija) koja čini četvrtu grupu i ADB (estuarno pjeskovita pozicija) koja formira petu grupu Ward dendograma (Slika8). Ovo je potvrđeno i PERMANOVA analizom gdje navedene grupe uzoraka na nivou OTU pokazuju značajnu razliku (pseudo-F, 6.46; $P < 0.05$).

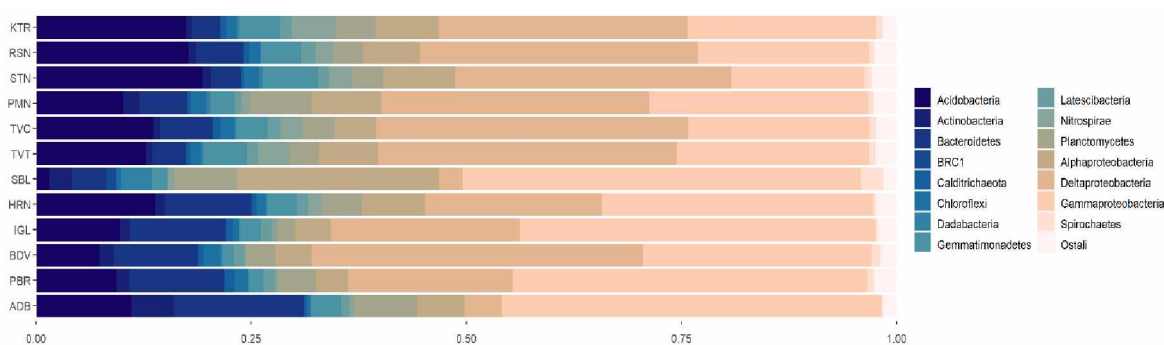


Slika 8 Klaster analiza Ward minimum varijanse bakterijskih zajednica na dvanaest ispitanih lokacija bazirana na Bray-Curtis indeksu sličnosti na nivou svih OTU

5.2.3 Struktura bakterijskih zajednica

Na osnovu analize svih podataka, identifikovano je 47 razdjela (phyluma) od čega je 13 razdjela prisutno sa relativnom abundancom $\geq 1\%$ u najmanje jednom uzorku.

Na osnovu prosječne relativne abundance izdvaja se 5 klasa na istraživanom području i to: *Gammaproteobacteria* (29.8%), *Deltaproteobacteria* (25.2%), *Alphaproteobacteria* (7.6%) u okviru phyluma *Proteobacteria* (62.52%), *Thermoanaerobaculia* (8.1%) u okviru phyluma *Acidobacteria* (12%) i *Bacteroidia* (6.30%) u okviru phyluma *Bacterioidetes* (7.4%) (Slika 9).



Slika 9. Relativna abundanca bakterijskih zajednica bazirana na taksonomskoj kategoriji phyluma i klasa (za phylum *Proteobacteria*) (≥ 0.01). Phylumi sa relativnom abundancom < 0.01 uključeni su u grupu " ostali"

Gamma- i *Deltaproteobacteria* su najbrojnije u svim uzorcima sedimenta osim lokacije SBL. Na ovoj lokaciji u središnjem dijelu Bokokotorskog zaliva najbrojniju zajednicu čine *Gammaproteobacteria* i *Alphaproteobacteria* sa više od 60% ukupne abundance. Na nivou phyluma, članovi BRC1, *Dadabacteria* i *Spirochaetes* prisutni samo na SBL lokaciji sa abundancom većom od 1% (1.1%; 3.5% i 2.6%). Zajednice koje pripadaju *Latescibacteria* prisutni su na svim pozicijama sa abundancom preko 1% osim na pozicijama PMN, SBL i ADB dok su zajednice phyluma *Chloroflexi* detektovane na lokacijama SBL, IGL i ADB. Klasa *Gammaproteobacteria* su najbrojnije na pozicijama SBL, HRN, IGL, PBR, ADB sa učešćem od 46.3%; 31.5%; 41.4%; 41.3% odnosno 44.1%. U okviru reda *Steroidobacterales*, familija *Woeseiaceae* bilježi maksimalnu abundancu 27.6% na ADB a zatim na IGL lokaciji 12.6%. Na ostalim ispitanim lokacijama, njihova abundanca varira od 2.4% do 9.2%.

Nasuprot tome, klasa *Deltaproteobacteria* su bile najbrojnije na pozicijama KTR, RSN, STN, PMN, TVC, TVT, BDV sa učešćem od 28.9%; 32.3%; 32%; 31.1%; 36.2%; 34.7% odnosno 38.6%.

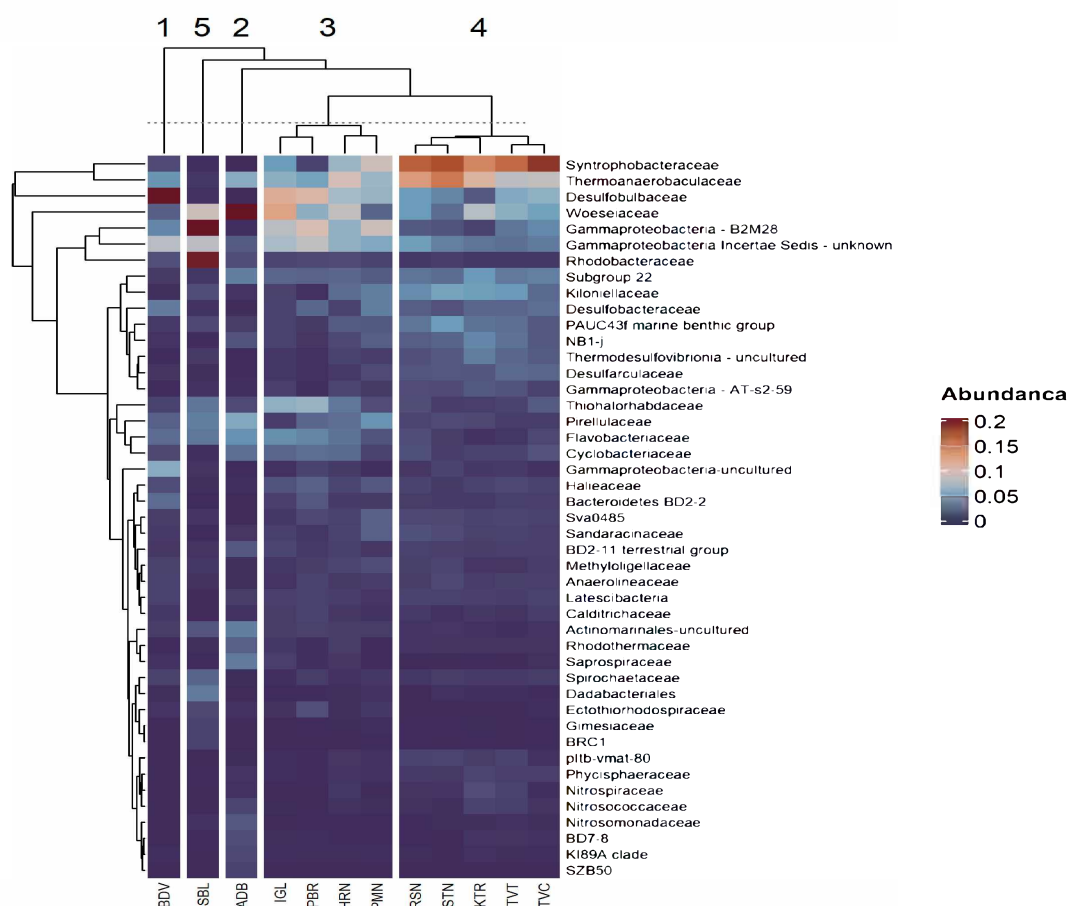
U okviru ove klase, *Desulfobulbaceae* i *Syntrophobacteraceae* su bile najzastupljenije. *Desulfobulbaceae* su varirale od 0.1% do 30.4% sa najvećom abundancom u BDV uzorku (Slika 10). *Syntrophobacteraceae* pokazuju vrijednosti od 0.1% do 18.6% sa zabilježenim maksimumom na TVT lokaciji.

Abundanaca klase *Alphaproteobacteria* je varirala od 3.8% do 23.5% sa maksimalnom abundancom u uzorku sedimenta na poziciji SBL. Brojnost predstavnika familije *Rhodobacteraceae* na lokaciji SBL dostiže maksimalnu vrijednost od 19.6% dok se na ostalim ispitanim lokacijama kreće od 0.6% do 1.7%. Abundanca *Bacteroidia* varira od 2.7% do 12.5% sa maksimalnom brojnošću na lokaciji ADB. Grupisanje uzoraka na taksonomskom nivou porodice (Slika 10) pokazuje odvajanje sledećih lokacija u zasebne grupe: SBL (sa najvećim PAH i PCB sadržajem), estuarna lokacija (ADB), marina jahti i brodica za ribolov (BDV).

U unutrašnjem i središnjem dijelu Bokotorskog zaliva (KTR, RSN, STN, TVT, TVC) bakterijske zajednice pokazuju sličnu strukturu grupišući se zajedno na nivou taksonomske kategorije porodice. Glavni predstavnici bakterijskih zajednica u ovom dijelu zaliva su *Syntrophobacteraceae* sa procentom od 14.3%; 16.5%; 17.3%; 18.6%; 15.9%.

Za razliku od *Syntrophobacteraceae*, *Woeseiaceae*, *Thermoanaerobaculaceae* i *Desulfobulbaceae* su prisutne sa dva puta manjom abundancom. U Kotorskom i Tivatskom zalivu klasa *Thermoanaerobaculia* dostiže abundance preko 10% sa maksimumom od 15.1% na lokaciji STN. Takođe familija *Thermoanaerobaculaceae* pokazuje maksimalnu vrijednost na STN lokaciji (15.1%), zatim RSN (13%) i KTR (11%). Lokacije u spoljašnjem dijelu Bokotorskog zaliva (HRN, IGL) grupišu se zajedno sa lokacijama PBR i PMN sa dominantnim taksonom sačinjenim od *Woeseiaceae* (8.7%, 12.6%), *Desulfobulbaceae* (7.3%, 11.6%) i *Thermoanaerobaculaceae* (9.8%, 6.3%). Lokacija PMN karakteriše prisustvo B2M28 (9.3%, *Gammaproteobacteria*) i *Syntrophobacteraceae* (9.4%). Na SBL lokaciji, B2M28 (20.9%) i *Rhodobacteraceae* (19.5%) su detektovani u značajnom broju dok *Woeseiaceae* broji 9.2%. Na lokaciji BDV i PBR dominiraju zajednice *Desulfobulbaceae* sa abundancom od 30.44% odnosno 10.83% , dok na lokaciji ADB najveću brojnost zauzima familija *Woeseiaceae* 27.58% pa *Thermoanaerobaculaceae* 6.15%. *Pirellulaceae* su prisutne sa abundancom od 5.78%.

Bakterijske grupe čija je prosječna abundanca manja od 5% u istraživanom sedimentu su: klasa *Planctomycetalia* (od 1.16% do 6.08%); klasa *Thermodesulfovibrionia* (od 0.15% do 3.49%); *Subgroup 22* (od 0.79% do 5.12%); PAUC43f (od 0.62% do 4.38%); *Anaerolineae* (od 0.66% do 1.82%); *Acidomicrobiia* (0.42% do 1.34%); *Phycisphaerae* (0.85% do 2.67%).



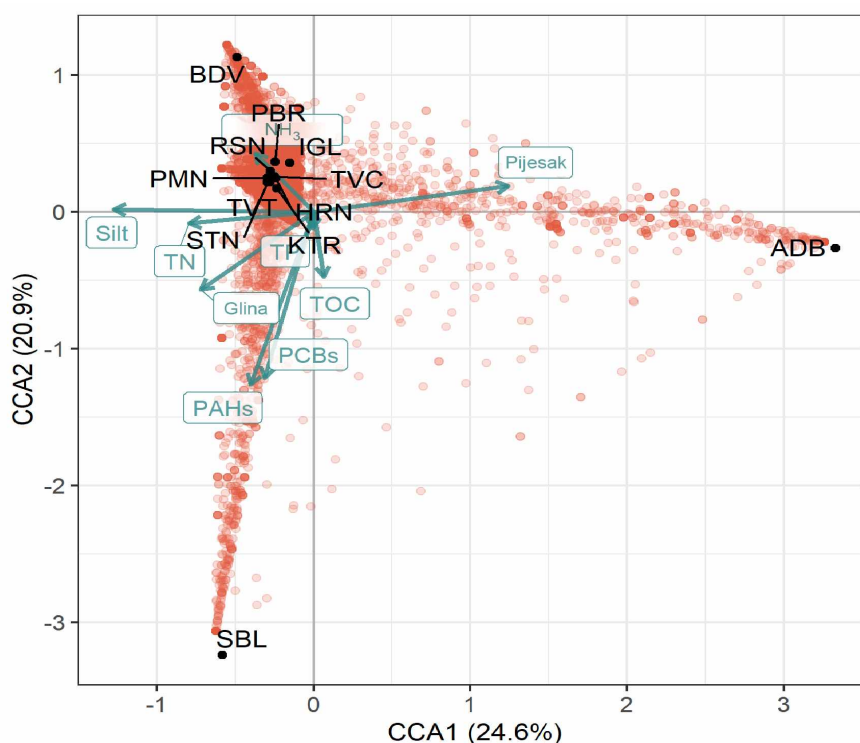
Slika10. Bakterijska distribucija i grupisanje na taksonomskom nivou porodice bazirano na Bray-Curtis indeksu sličnosti. Redovi predstavljaju relativnu abundancu bakterija (≥ 0.01) a kolone predstavljaju različite uzorke. Relativna abundanca svake porodice je prikazana određenom bojom prikazanom u natpisu

5.3 Povezanost bakterijskih zajednica, hemijskih i granulometrijskih parametara

Kanonijska korespondentna analiza pokazuje povezanost OTU bakterijskih zajednica sa hemijskim i granulometrijskim parametrima. Uočljivo je da PAH i PCB sadržaj u najvećoj mjeri utiče na distribuciju bakterijskih zajednica na lokaciji SBL (Slika 11). Kako je prikazano na pomenutoj slici, x osa je pod uticajem PAH, PCB, TOC, TP, glinovitog i pijeskovitog sadržaja. y osa je više pod uticajem TN i pjeskovitog sadržaja kao i amonijaka.

Ova multivarijantna analiza objasnjava 45.5% varijabilnosti. Primjenjen je ANOVA test da utvrdi značajne razlike između parametara.

Rezultati pokazuju da PAH ($F=3.551$), TOC ($F=2.151$), glinoviti sadržaj ($F=2.131$), imaju najveći uticaj na varijacije bakterijskih zajednica. Najmanji uticaj ima amonijak ($F=0.7947$).

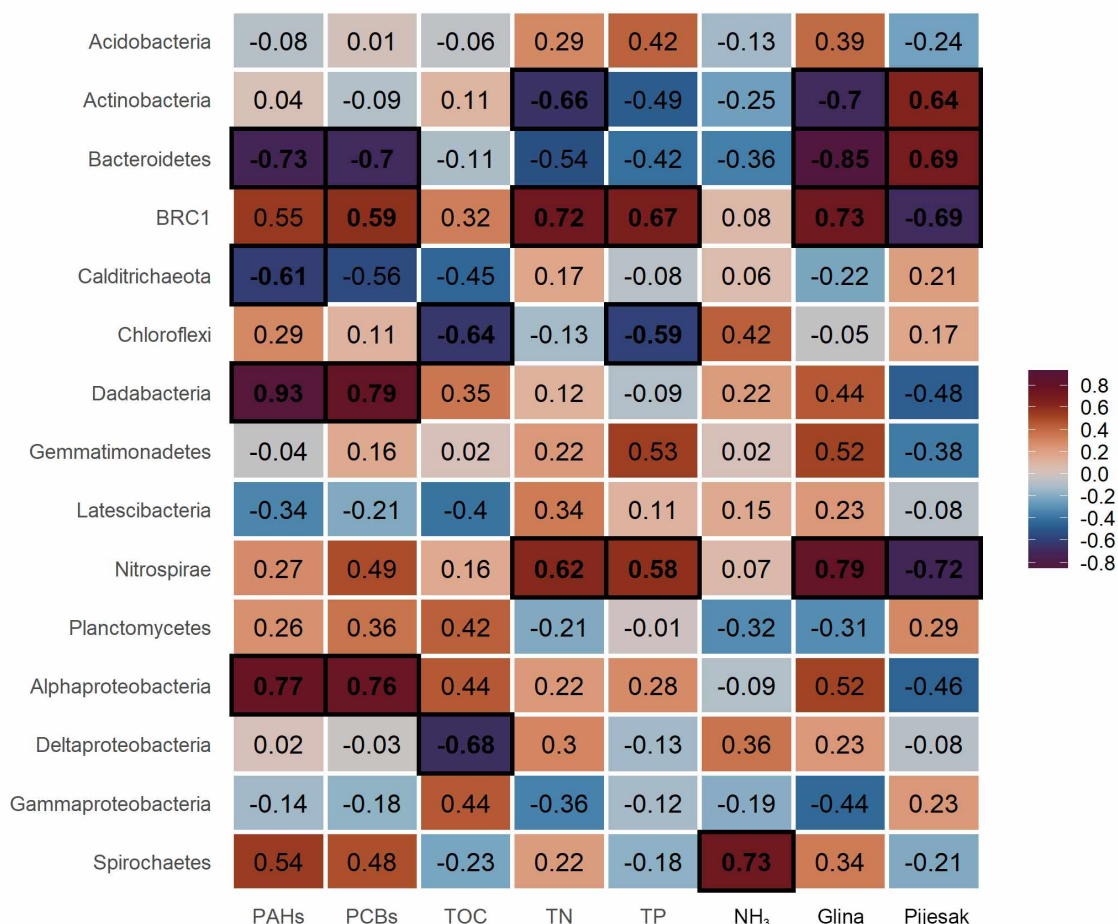


Slika 11. CCA Ordinacijski dijagram. Povezanost između hemijskih i granulometrijskih parametara prezentovani kao vektori (PAH, PCB, NH_3 , TOC, TN, TP, mulj, glina, pijesak) i taksonomske kompozicije na nivou svih OTU zajednica. Crne tačke predstavljaju lokacije, crvene tačke predstavljaju OTU. Hemijski parametri su predstavljani vektorima tj. strelicama

Abundantna bakterijska grupa *Alphaproteobacteria* je pokazala pozitivnu korelaciju sa PAH i PCB (Slika 12). *Bacterioidetes* je pokazao negativnu korelaciju sa PAH, PCB, TN i muljevitim sadržajem, dok je pozitivna korelacija utvrđena sa pjeskovitim sadržajem.

Deltaproteobacteria su značajno negativno korelisane sa TOC dok su *Spirochaetes* pokazale pozitivnu korelaciju sa amonijakom. Bakterijske grupe *Dadabacteria* i BRC 1, zastupljene samo na SBL lokaciji, pokazuju značajne korelacije sa ispitanim parametrima. *Dadabacteria* su pozitivne korelisane sa PAH i PCB a BRC1 pokazuje pozitivnu korelaciju sa PCB, TN, TP i muljevitim sadržajem, a negativnu sa pjeskovitim sadržajem. *Nitrospirae* daju pozitivnu korelaciju sa TN, TP i glinovitim sadržajem dok su negativno korelisane sa pjeskovitim sadržajem. *Actinobacteria* su negativno korelisane sa TN i glinovitim

sadržajem dok u odnosu na pjeskoviti sadržaj bilježe pozitivnu korelaciju. *Chloroflexi* pokazuju negativnu korelaciju sa TP i TOC (slika 12).

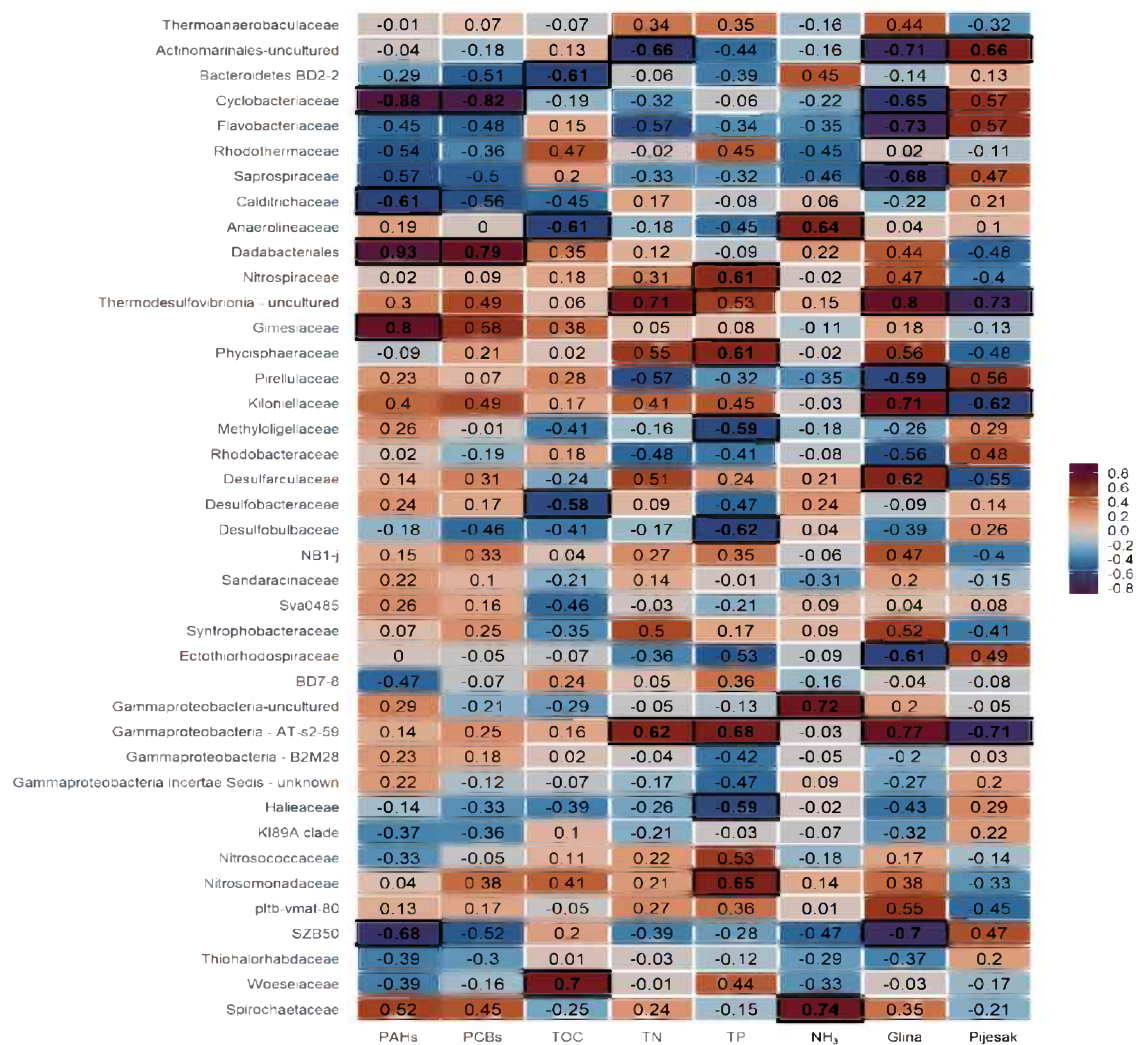


Slika 12. Spermanova korelacija bakterijskih zajednica analizirana na nivou phyluma i klase (za phylum *Proteobacteria*) sa hemijskim i granulometrijskim parametrima. Boja ukazuje da li je korelacija pozitivna (crvena) ili negativna (plava). Boldovane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju zajednica na nivou razdjela (klase) sa hemijskim i granulometrijskim parametrima ($p \leq 0.05$).

Abundantne bakterijske zajednice na nivou familije, kao *Woeseiaceae* i *Desulfobulbaceae* pokazale su pozitivnu korelaciju sa TOC odnosno negativnu korelaciju sa TP.

Osim abundantnih vrsta TP je značajno korelisan sa većim brojem zajednica na nivou familije a to su: *Nitrospiraceae*, *Phycisphaeraceae*, *Gammaproteobacteria* AT-s2-59, *Nitrosomonadaceae*, *Haliaceae*, *Methyloligellaceae* (Slika 14). *Cyclobacteriaceae* su negativno korelisane sa PAH i PCB dok su *Dadabacteriales* pokazale značajnu pozitivnu korelaciju sa PAH i PCB. PAH je takođe korelisan i sa familijama *Gimesiaceae*.

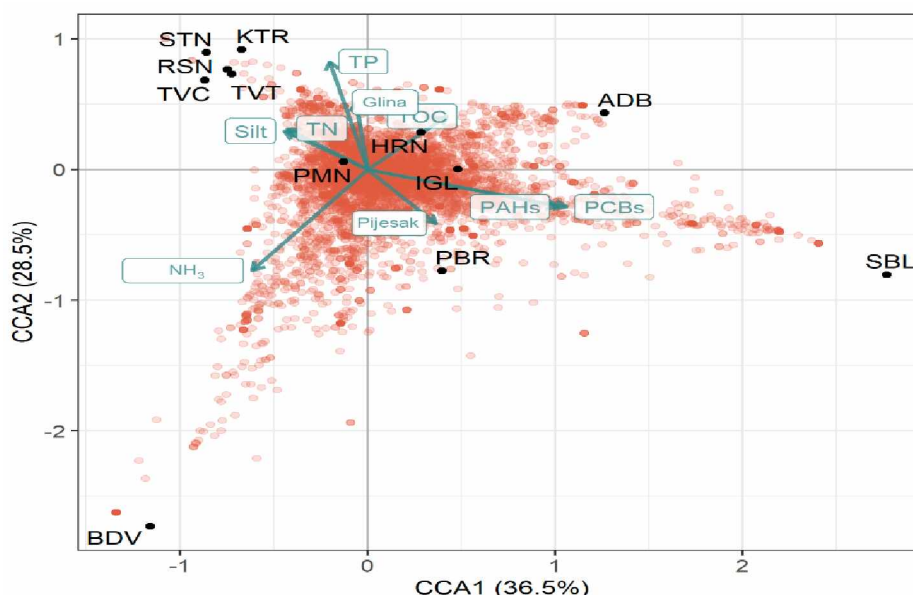
Glinovit sadržaj sedimenta je značajno korelisan sa većim brojem familija kao što su: *Flavobacteriaceae*, *Cyclobacteriaceae*, *Saprospiraceae*, *Thermodesulfovibrionia*, *Pirellulaceae*, *Kiloniellaceae*, *Gammaproteobacteria* -AT-s2-59. TN je značajno korelisan sa *Actinomarinales*, *Thermodesulfovibrionia* i *Gammaproteobacteria* -AT-s2-59. Amonijak je pokazao značajnu korelaciju sa *Anaerolineaceae*, neuzgojivim predstavnicima *Gammaproteobacteria* i *Spirochaetaceae* (Slika 13).



Slika 13. Spermanova korelacija bakterijskih zajednica analizirana na nivou familije. Boja ukazuje da li korelacija pozitivna (crvena) ili negativna (plava). Boldovane vrijednosti pokazuju značajnu korelaciju zajednica na nivou familije i hemijskih parametara ($p \leq 0.05$).

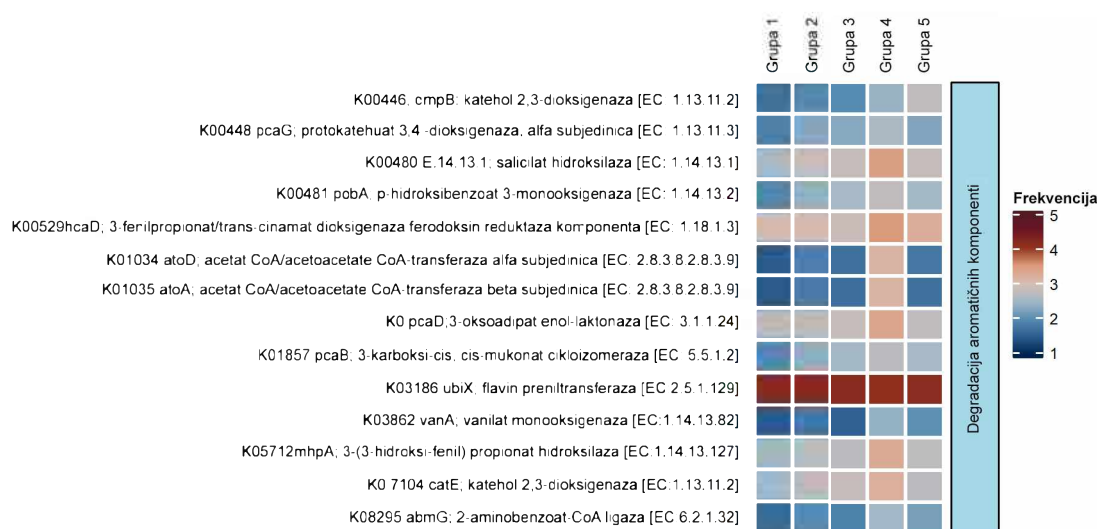
5.4 Analiza učestalosti gena i metaboličkih puteva

Rezultati softvera PICRUST pokazuju identifikaciju 6530 gena povezanih sa 401 metaboličkim putem. CCA ordinacioni biplot na nivou gena rezultira sličnim grupisanjem uzoraka sedimenta kao i na nivou OTU (Slika 14). Ova multivarijantna analiza objašnjava 65% varijabilnosti. PAH i PCB najviše uticaja imaju na učestalost gena na SBL lokaciji, Pjeskoviti sadržaj utiče na učestalost gena na PBR lokaciji, dok muljeviti sadržaj sedimenta, TP, TN ima uticaj na učestalost gena u unutrašnjem i spoljašnjem dijelu Bokokotorskog zaliva (KTR, STN, RSN, TVT, TVC). Amonijak ima uticaj na učestalost gena BDV lokacije.



Slika 14. CCA Ordinacijski dijagram. Povezanost između hemijskih parametara prezentovani kao vektori (PAH, PCB, NH₃, TOC, TN, TP) i grupe gena KOs na ispitanim lokacijama

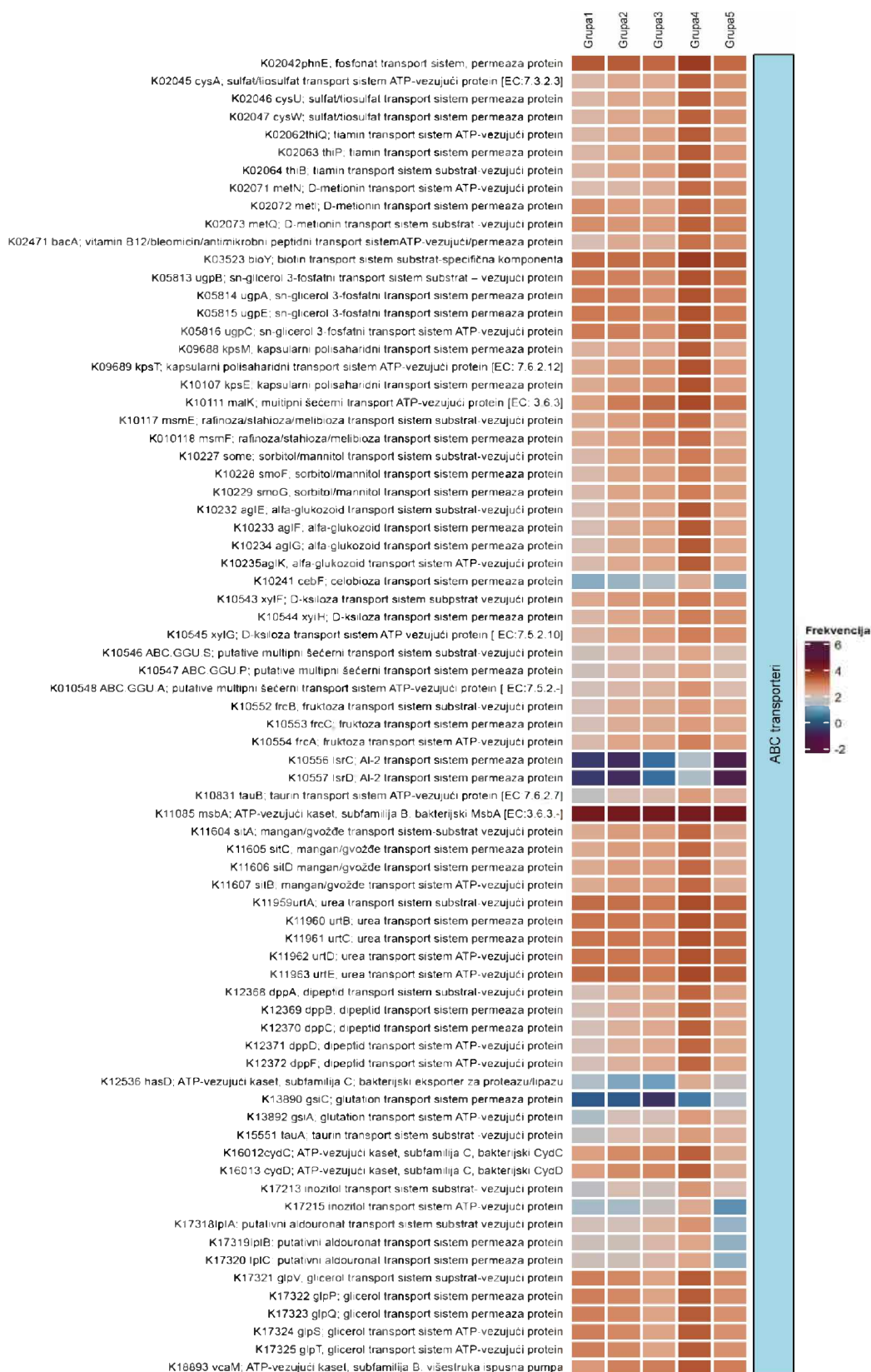
Da bi ispitali uticaj PAH i PCB na proporciju predviđenih gena uključenih u degradaciju aromatičnih jedinjenja i povezanih sa ABC transporter proteinima, sve lokacije su podijeljene u pet grupa bazirane na rezultatima dendrogram analize svih OTU shodno slici 8. Na slici 16 prikazana je prosječna frekvencija gena u različitim grupama uzoraka: grupa 1 (TVT, KTR, RSN, STN, TVC), grupa 2 (IGL, HRN, PMN), grupa 3 (BDV, PBR), grupa 4 (SBL) i grupa 5 (ADB). Selektovani geni imaju značajno veću frekvenciju u grupi 4 (SBL) nego u ostalim klasterima (Slika 15).



Slika 15. Frekvenciona mapa različitih gena (KOs) povezanih sa aktivacijom različitih enzima za degradaciju aromatičnih komponenata između grupisanih uzoraka. Podaci frekvencije gena transformisani su u log 10 zbog bolje vizualizacije.

Vidljivo je da SBL lokacija pokazuje veću frekvenciju gena kodiranih za degradaciju različitih aromatičnih jedinjenja kao što su katehol, fenol, naftalen, fenantren, benzoat. Važno je napomenuti da ADB lokacija označena kao grupa 5 ima značajno veću frekvenciju gena uključenih u fenol/toluen degradaciju u odnosu na ostale lokacije. Rezultat dmpP fenol/toluen 2 monooksigenaze (NADH) P5/A5 [EC:1.14.13.244, 1.14.13.243] iznosi 237 dok se na ostalim lokacijama kreće od 3 do 63.

Na svim lokacijama dominiraju sledeći degradacioni procesi vezani za aktivaciju specifičnih enzima: K01512 acyP; acilfosfataza [EC:3.6.1.7] aminobenzoat degradacija, K00128 ALDH; aldehyd dehidrogenaza (NAD⁺) [EC:1.2.1.3] hloralkan i hloralken degradacija kao i K03186 ubiX; flavin preniltransferaza [EC:2.5.1.129] aminobenzoat degradacija. Na lokaciji SBL K00001 [E1.1.1.1]; alkohol dehidrogenaza vezana za hloralkan i hloralken degradaciju pokazuje veću učestalost, zatim K00480 [E1.14.13.1] salicilat hidroksilaza, kao i K00448 pcaG; protokatehualat 3,4-dioksigenaza, alfasubjedinica [EC:1.13.11.3] vezane za degradaciju polikarbonatnih aromatičnih jedinjenja. Frekvencija gena koji kodiraju ABC transportne proteine su značajno veći na SBL lokaciji i povezani su sa transportom biotina, uree, glicerola, sulfata, polisaharida, metionin transportom kao i fosfatnim transportnim sistemom (Slika 16). Nije utvrđena značajna korelacija između većine gena uključenih u degradaciju PAH i PCB sa genima uključenim u ABC transportne proteine.



Slika 16. Frekvenciona mapa različitih gena (KOs) povezanih sa ABC transportnim proteinima između grupisanih uzoraka ($p \leq 0.05$). Podaci frekvencije gena transformisani su u log 10 zbog bolje vizualizacije.

U tabeli II (prilog) prikazane su najznačajnije korelacije hemijskih parametara sa utvrđenim metaboličkim putevima. Najznačajnije negativne korelacije PAH, PCB, TN i NH_3 utvrđene su sa menakinol i demetilménakinol biosintezom. Najznačajnije pozitivne korelacije TOC povezane su sa metabolizmom horizmata i L-arginin degradacijom, dok su negativne korelacije TOC povezane sa Calvin-Benson-Bassham ciklusom kao i glutamat degradacijom. Aerobna respiracija je negativno korelisana sa PCB i TN. TP je negativno korelisan sa 1,5 anhidrofruktoznom degradacijom kao i vanillin i vanilat degradacijom.

U tabeli III (prilog) prikazane su značajne korelacije ABC transportnih proteina sa ispitivanim hemijskim parametrima. Glicerol fosfatni transportni sistem, fosfonat transportni sistem, putreskin transportni sistem, biotin transportni sistem pokazuje značajne pozitivne korelacije sa PAH i PCB, dok je urea transportni sistem korelisan samo sa PCB sadržajem. Transportni sistem aminokiselina kao i biotin transportni sistem pokazuje značajnu korelaciju sa PAH.

Glutamat/aspartat transportni sistem pokazuje značajnu negativnu korelaciju sa TP i TN dok je trehaloza/maltoza transportni sistem negativno korelisan sa NH_3 . Fosfolipidni kao i oligopeptidni transportni sistem korelisan je sa TN dok je cink transportni sistem korelisan sa PAH i NH_3 . Gvožđe transportni sistem povezan je pozitivnom korelacijom sa TOC.

6. DISKUSIJA

Brojni prirodni i antropogeni uticaji kao što su eutrofikacija, hemijsko zagađenje, otpadne vode utiču na prokariotske zajednice u sedimentu. Duž Crnogorske obale pojedini izvori zagađenja mogu se povezati sa neriješenim pitanjem otpadnih voda, rastom nautičkih i pomorskih aktivnosti. Turizam predstavlja glavni izvor prihoda u Crnoj Gori. U toku turističke sezone broj stanovnika se uveća nekoliko puta i intenzivira pomorski saobraćaj što sigurno povećava rizik po obalni morski ekosistem. Duž cijele crnogorske obale prisutna je ekspanzija urbanizacije kao i odlaganje otpada raznog porijekla u blizini mora ili direktno u more. Svi ovi faktori doprinose narušavanju kvaliteta sedimenta.

6.1 Hemijska komponenta

Osobine, aktivnosti i raspodjela mikroorganizama u moru zavise od uslova u ekosistemu i obrnuto, određeni faktori koji vladaju u moru su pod direktnim uticajem mikroorganizama (Nogales i sar., 2010; Rodriguez i sar., 2018) Hemijske analize potvrđuju da su lokacije SBL i PMN visoko zagađene u odnosu na PAH i PCB polutante prema propisanoj klasifikaciji što potvrđuju i raniji rezultati na ovom području (Barić i sar. 2009; Kljajić i sar. 2012). Potrebno je istaći da je najveća koncentracija PAH i PCB komponenti detektovana u lukama i brodogradilistu gdje je pomorski saobraćaj najintenzivniji ukazujući na to da su luke veliki izvor zagađenja sedimenta (Frena i sar., 2017).

Porijeklo PAHa može se pripisati i obogaćivanju nutrijentima, nepotpunom sagorijevanju goriva u lukama (PBR, KTR), luksuznoj marini (PMN) kao i marini Budva (BDV). Aktivnosti vezane za procese brodogradilista na lokaciji SBL doprinose pirolitičkom porijeklu PAHa budući da ova jedinjenja dominiraju sa više od 3 aromatična prstena. Potencijalni izvor zagađenja mogle bi biti veće količine otpadnog materijala i grita na ovoj lokaciji (Mandić i sar., 2016). Za razliku od analiza koje su obuhvatale monitoring stanja ekosistema Crne Gore 2011 godine gdje se Luka Bar pominje kao lokacija sa povećanim koncentracijama PAH supstanci tokom naših istraživanja nije detekovana veća količina ovih supstanci. Razlog tome može biti i česta resuspenzija sedimenta usled pomorskih aktivnosti koja utiče na odnos voda-sediment. Takođe izračunavanjem odnosa između PAH izomera rezultati upućuju na pirogenično porijeklo nastalo od sagorijevanja fosilnih goriva ili organskog materijala i povećano je u akvatičnim sredinama sa povećanim brojem

vozila i saobraćaja kao i populacije u obalnom području (Wang i sar., 2001; Boitsov i sar., 2013).

Fluoranten je termodinamički manje stabilan od pirena i dominacija fluorantena nad pirenom je takođe karakteristika pirolitičkih produkata (Spasojević, 2015). Najtoksičniji PAH je benzo(a)piren (3,4-benzopiren) čija je koncentracija takođe povećana na lokalitetima PMN i SBL. Pirogenični procesi su dominantni emisijski izvori PAHa i u drugim lukama kao što su Kaljari Luka, Luka El Kantaoui u Tunisu, Heraklion luka na Kritu. Treba napomenuti da je koncentracija PAH i PCB vrijednosti značajno niža u spoljašnjem dijelu zaliva i vanzalivskom području. Lokacija ADB je ocjenjena kao najmanje zagađena. Tome doprinosi i pjeskovita struktura sedimenta. Pjeskoviti sedimenti čiji je promjer zrna veći od 63 mikrometara imaju malu specifičnu površinu za sorpciju zagađivača stoga ne zadržavaju zagađujuće supstance. Nasuprot njima sedimenti pretežno sastavljeni od gline i prahova (promjer zrna manji od 63 mikrometara) imaju veliki odnos površine zrna prema masi te su takvi sedimenti zbog velike specifične površine čestica podložni zadržavanju kontaminanata (GIPME, 2000). Primjećuje se značajno veća koncentracija PAH komponenti na lokaciji SBL u odnosu na neka slična istraživanja Mar Piccolo Taranto, Italija (Cardellicchio i sar., 2007), Sjeverni Jadran (Bihari i sar. 2006), Riječki akvatorijum Korlević i sar. (2015), Luka Kaljari (Vitali i sar., 2019). Perzistentnost PAH-ova u atmosferi raste takođe sa porastom sadržaja organskog ugljenika u čestičnoj materiji, kao i sa porastom količine PAH-ova koji su adsorbovani na ovoj materiji. (Spasojević, 2015).

Maksimalne koncentracije PCB komponenti zabilježene su na lokaciji SBL, dok takođe neke komponente upućuju na zagađenja na lokalitetima KTR, PMN, SBL. Ovi rezultati su nešto niži od publikovanih vrijednosti u oblasti Mar Piccolo Taranto, Italija (Cardellicchio i sar., 2007), Venecijanska laguna (Frignani i sar., 2001), Luka Aleksandrije kao i Luka Tripoli (Merhaby i sar., 2015). PCB su otporni organski polutanti u široj upotrebi u industriji. Iako je industrijska proizvodnja PCB zabranjena još kasnih 1970tih, hronična toksičnost ovih opasnih supstanci je i dalje prisutna.

Organski ugljenik, azot i amonijak u sedimentima vode porijeklo od razlaganja bljinih i životinjskih ostataka a mogu imati i antropogeno porijeklo: hemijski kontaminanti, otpadne vode. Poslednjih 15-ak godina u Bokotorskom zalivu se registruje pojava eutrofikacije kao rezultat povećanog dotoka hranjivih soli i organske materije padavinama a i

nepročišćenim gradskim otpadnim vodama (Regner 2005, Krivokapić 2008). Varijabilnost TOC/TN odnosa veća je u poluzatvorenim i plićim vodenim sistemima zbog mješovite prirode porijekla organske materije (Frena i sar., 2017).

Stepen organskog ugljenika je varirao od niskog do srednjeg u ispitanim uzorcima. Za razliku od spoljašnjeg dijela Bokokotorskog zaliva gdje je prisutna veća razmjena vodenih masa, unutrašnji dio je plići i zatvoreniji. Tokom ljetnjih mjeseci u ovom dijelu zaliva intenzitet strujanja je slabiji što uzrokuje slabu razmjenu vodene mase, pa je očekivano da je najveći sadržaj ukupne organske materije, azota i fosfora zabilježen na lokaciji KTR.

Maksimalan sadržaj TN na lokaciji KTR je veći od publikovanih vrijednosti u Grčkoj (Ladakis i sar. 2006); Bohai Zaliv, Kina (Wang i sar. 2015), sjeveroistočni Jadran (Vidović i sar. 2016). Koncentracija TOC često se povezuje sa distribucijom PAH jedinjenja u sedimentu. Što je veća količina organske materije u sedimentu veća je i količina ovih polutanata posebno u glinovitom tipu sedimenta (Wang i sar., 2014). Pozitivna korelacija između ukupnog sadržaja policikličnih hidrokarbonskih jedinjenja i ukupnog organskog ugljenika ($r = 0.9637$) detektovana je u istraživanjima Mohd Ali & Yep (2016). U našim istraživanjima nije nađena korelacija između TOC i PAH u sedimentu što potvrđuju i rezultati obalnih sedimenata Meksičkog zaliva (Wang i sar., 2014). Međutim zabilježena je značajnija korelacija PAH sa C/N ($p < 0.5$; $r = 0.536$). Pozitivna korelacija PAH sa C/N je pronađena i u istraživanjima Ladakis i sar. (2006). Wang i sar. (2014) sugerišu da se PAHovi preventivno bolje vežu za zemljišnu organsku materiju u odnosu na algalnu organsku materiju. Organska materija zemljišnog porijekla sadrži više aromatičnih ostataka pa se očekuje povezivanje aromatičnih jedinjenja sa zemljišnom organskom materijom. Na lokacijama SBL, PMN i KTR gdje je organska materija zemljišnog porijekla zabilježene su i najveće vrijednosti PAH i PCB.

Najveći sadržaj amonijaka na lokacijama TVT i BDV može ukazivati na povećanu stopu sedimentne remineralizacije. Amonijak se uglavnom oslobađa u pore sedimenta ispunjene vodom u procesu amonifikacije uz razlaganje proteina, peptida i aminokiselina od strane mikroorganizama proteolitičkim enzimima i deaminazama (Reyes i sar., 2017). Visok sadržaj amonijaka može znatno uticati na brojnost i fiziologiju akvatične biote (Camargo i Alonso, 2006; Romano i Zeng, 2013).

Zbog povećanog dotoka nutrijenata rijekama, obilnijim padavinama, netretiranim otpadnim vodama, specifičnim hidrografskim uslovima Kotor i Risan su najviše izloženi procesu eutrofikacije poslednju deceniju (Krivokapić i sar., 2018). Budući da je uzorkovanje

izvršeno u septembru kada je dotok slatke vode sveden na minimum, unutrašnji dio Bokokotorskog zaliva je vjerovatno bio pod većim pritiskom otpadnih voda tokom turističke sezone što je rezultiralo najvećim sadržajem TOC, TP i TN na ovim lokacijama. Fosfor u sedimentu dospijeva tonjenjem i taloženjem, partikularne materije koja sadrži neorgansku i organsku komponentu (Defforey i Paytan, 2018). Lokacija ADB ima najveće vrijednosti TOC/TP odnosa što može ukazivati na povećanje produktivnosti u vodenom stubu kao odgovor na povećan unos fosfora u ekosistemu.

6.2 Mikrobiološka komponenta

Hemijski polutanti i nutrijenti se akumuliraju u sedimentu i oblikuju prokariotsku zajednicu (Wang i sar., 2016; Rodriguez i sar. 2018). Prostorna distribucija i ekološki faktori koji utiču na mikrobnu zajednicu u sedimentu nisu ispitani u velikoj mjeri, uprkos ekološkom i evolutivnom značaju živog svijeta u marinskim sedimentima.

U našim istraživanjima *Gamma*-, *Delta* – i *Alpha Proteobacteria* dominiraju u ispitanim uzorcima sedimenata. Mnoge studije pokazuju dominaciju phyluma *Proteobacteria* sa različitim promjenama u kompoziciji klasa u sedimentima marinskih ekosistema (Wang i sar., 2015; Sun i sar., 2013; Korlević i sar., 2015; Obi i sar., 2016, Gao i sar., 2018, Di Cesare i sar., 2020). Na lokaciji (SBL) prisustvo članova *Gammaproteobacteria* je povezano sa ranim stadijumom razgradnje hidrokarbonskih jedinjenja (Acosta-González i sar., 2013; Quero i sar., 2015). Povećani stepen zagađenja vjerovatno utiče na pojavu *Alphaproteobacteria* (pozitivna korelacija) koje posjeduju biohemijske i ekološke kapacitete da degradiraju organske polutante. Korlević i sar. (2015) konstatuju izmjene mikrobnih zajednica na pozicijama sa najvećim sadržajem PAH u sedimentima sjevernog Jadrana i ističe da preko 40% ispitanih sekvenci pripada *Gamma* i *Alpha Proteobacteriama*. Prethodno je potvrđeno da *Gamma*- i *Alphaproteobacteria* imaju sposobnost koristiti alifatične i aromatične komponente gdje članovi zajednice *Gammaproteobacteria* doprinose ranoj fazi degradacije (oksidacija reaktivnih komponenti kao što su n-alkani) a *Alphaproteobacteria* kasnijoj fazi degradacije (oksidacija komponenti kao što je PAH) (Kostka i sar., 2011; Acosta-González i sar. 2013, Quero i sar., 2015).

U sjeverozapadnom dijelu obale Španije pratio se uticaj zagađenja sirove nafte 18 i 53 mjeseca nakon potonuća tankera i utvrđeno je da *Gamma*-, *Deltaproteobacteria* kao i *Acidobacteria* dominiraju nakon 18mjeseci. Ovi rezultati potvrđuju veliku plastičnost

bakterijskih zajednica ukazujući na to da se one stalno prilagođavaju na promjene u životnoj sredini (Acosta-Gonzales i sar. 2013). Brojnost *Rhodobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*) je deset puta veća na SBL lokaciji u odnosu na ostale ispitane lokacije.

Međutim pomenuta grupa nije statistički povezana sa PAH i PCB. Familija *Rhodobacteraceae*, jedna je od devet najrasprostranjenijih grupa u marinskom ekosistemu (Pohlner i sar., 2019). *Polymorphum* koji pripada ovoj familiji je prepoznat po sposobnosti razgradnje sirove nafte u morskim sredinama (Nie i sar., 2012).

U ispitanim uzorcima sedimenta, najveća abundanca *Gammaproteobacteria* je zabilježena na lokacijama sa najvećim sadržajem TOC i TP. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa pojavom da *Gammaproteobacteria* brže rastu u prisustvu veće količine nutrijenata i organske materije u moru (Zhou i sar., 2011; Sipler i sar., 2017). Takođe, *Gammaproteobacteria* su prepoznate kao najbrojnija bakterijska zajednica u morskim sedimentima (Kostka i sar., 2011; Acosta-González i sar., 2013).

Naši podaci upućuju na prisustvo familije *Woeseiaceae* u okviru reda *Steroidobacterales* posebno na ADB lokaciji (pjeskoviti sediment). Kokoidne i okrugle *Woeseia* ćelije naseljavaju u najvećoj mjeri pjeskovita zrna sedimenta (Probdant i sar., 2018). Novije studije pokazuju da neke vrste *Woeseiaceae* vrše CO₂ fiksaciju u obalnim sedimentima a potvrđeno je i njihovo učešće u asimilaciji acetata, ključnog posrednika u anaerobnoj mineralizaciji organske materije, u svim slojevima sedimenta (Dyksma i sar., 2018).

Ova familija pokriva veliki fiziološki spektar bakterija koje obezbjeđuju adaptacije na različite biogeohemijske promjene što vjerovatno objašnjava njihovu rasprostranjenost u sedimentima širom svijeta. Takođe grupa B2M28 (*Gammaproteobacteria*) u najvećem procentu je prisutna na lokaciji SBL i PMN, dok je na ostalim lokacijama zanemarljivo mala. Cifuentes i sar. (2000) povezuju ovu grupu sa sumpor oksidujućom grupom bakterija u ensosimbiontima u sedimentu.

U okviru klase *Deltaproteobacteria* izdvajaju se *Syntrophobacteraceae* i *Desulfobulbaceae* koje pripadaju sulfat redukujućim bakterijama (SRB). U marinskim sedimentima, sulfatna redukcija je glavni put razgradnje organske materije gdje je najviše uključen red *Desulfobacterales* (Mahmoudi i sar., 2015; Zhang i sar., 2019). Eksperimenti in situ Dyksma i sar. (2018) pokazuju da predstavnici *Desulfobacterales* u velikoj mjeri asimiluju acetat (međuproizvod anaerobne mineralizacije organske materije u morskim sedimentima) uprkos niskom unosu.

U ovoj studiji vezano za Crnogorsko primorje najveća abundanca *Desulfobulbaceae* registrovana je na lokaciji BDV koji su uglavnom hemorganoheterotrofi (Zhang i sar., 2019). Produkcija veće količine hidrogen sulfata uz smanjenje kiseonika može dovesti do inhibicije važnih mikrobioloških procesa kao što je nitrifikacija (Hicks i sar., 2018).

Ovo može objasniti veći sadržaj amonijaka na lokaciji BDV. Nalaz SRB bakterija zajedno sa brojnom grupom koja vrši aerobnu sulfatnu oksidaciju (npr. *Gammaproteobacteria*) ukazuje na brzu izmjenu između oksičnih i anoksičnih uslova na površini sedimenta što je vjerovatno povezano i sa sezonskim uslovima (Zoppini i sar., 2019).

Familija *Syntrophobacteraceae* broji najveću abundancu u unutrašnjem (KTR, RSN) i središnjem (STN, TVC) dijelu Bokokotorskog zaliva. U marinskim sedimentima gdje su sulfati prisutni u većoj količini ovaj tip bakterija koristi produkte primarne fermentacije oksidišući ih do CO₂. Povećanje temperature morske vode sa rastom pomenute grupe bakterija može uticati i na smanjenje koncentracije kiseonika kao i na formiranje anoksičnih "hot spot" mjesta unutar površine sedimenta (Mahmoudi i sar. 2015; Hicks i sar., 2018).

Nakon *Proteobacteria*, najzastupljeniji phylum jeste *Acidobacteria*. Istraživanja njihovog genoma otkrivaju fiziološku i metaboličku promjenljivost koja im omogućava da se adaptiraju na promjene u sedimentu.

Zbog još uvijek malog broja sekvenciranih genoma i teškoća kada je kultivacija u pitanju, ekološka uloga ovog phyluma nije do kraja objašnjena (Kielak i sar., 2016). Familija *Thermoanaerobaculaceae* (subgrupa 10 i subgrupa 23) su identifikovane u svim uzorcima sedimenta ali najveći procenat dostižu na lokacijama KTR, RSN, STN. Ovaj dio zaliva je u istraživanjima Krivokapić i sar., (2011); Drakulović i sar. (2016); Jkanović i sar. (2016) klasifikovan kao mezotrofno i eutrofno područje sa hipoksičnim epizodama. Poznato je da pojedine podgrupe *Acidobacteria* preferiraju staništa sa većom količinom dostupnih nutrijenata. U nekoliko slučajeva *Acidobacteria* javlja se tolerancija na različite polutante kao što su PCB i naftna jedinjenja (Sanchez-Peinado i sar., 2010).

U našim istraživanjima treći po zastupljenosti phylum je *Bacteroidetes* u okviru koga se izdvaja klasa *Bacteroidia*. Najveću abundancu neuzgojivi predstavnici *Cyclobacteriaceae* i *Flavobacteriaceae* dostižu na lokaciji ADB koja je pod uticajem rijeke Bojane. Članovi roda *Bacteroidetes* pokazuju sposobnost hidrolize i iskorišćavanja različitih resursa

jedinjenja ugljenika. Neke vrste familije *Cyclobacteriaceae* poznate su po razgradnji polisaharida i drugih makromolekula kao što su kazein i lipidi (Pinnaka i Tanuku, 2014).

Veća abundanca phyluma *Bacteroidetes* na zagađenim mjestima, posebno estuarskim, se može pripisati i njihovom slatkovodnom porijeklu (Oregaard i Sørensen, 2007; Quero i sar., 2015). Eksperimenti Siles i Margesin (2018) pokazuju da pojedini članovi klase *Bacteroidia* “pomažu” pri uklanjanju PAH komponenti. Međutim u našim istraživanjima je evidentno da članovi grupe nisu tolerantni na PAH komponente budući da je *Bacteroidia* negativno korelisana sa PAH i PCB.

Podjetićemo se da se mikrobiom sedimenta Crnogorskog primorja najvećim dijelom sastoji od *Gamma*-, *Delta*-, *Alphaproteobacteria* i *Acidobacteria*. Ovakva struktura prisutna je i u istraživanjima Korlević i sar. (2015) u Sjevernom Jadranu kao i Sun i sar. (2013) u južnoistočnim obalnim sedimentima Australije uprkos različitoj geografskoj distanci. Quero i sar.(2015) nalaze raznovrsniji mikrobiom u svojim istraživanjima u obalnim sedimentima Jonskog mora i navode da razlike potiču i u odnosu na tip, stepen i istoriju zagađenja.

Uprkos malom procentu, članovi BRC1, *Dadabacteria* i *Spirochetes* su prisutni na najzagađenijoj poziciji SBL sugerišući potencijalnu selekciju ovih grupa u odnosu na PAH i PCB. Rekonstruišući centralni metabolizam BRC1 otkriva se mogućnost fermentacije i kompletne oksidacije organskih supstrata kroz aerobnu i anaerobnu respiraciju (Kadnikov i sar., 2019), dok *Dadabacteria* pokazuju potencijal razgradnje partikularne organske materije, posebno peptidoglikana i fosfolipida (Graham i Tully, 2020). Genom *Dadabacteria* je prvi put rekonstruisan iz industrijskog aktivnog mulja gdje podaci prikazuju da ova grupa posjeduje kapacitet za ugljenik fiksaciju kroz 3-hidroksibutirat/4-hidroksipropionat ciklus. Nemaju uzgojivih predstavnika i njihovo učešće u biogeohemijskim ciklusima nije do kraja razjašnjeno (Wang, 2014).

Detektovane *Spirochetes* nisu korelisane sa PAH i PCB, suprotno nedavnim istraživanjima (Dong, 2018) gdje se ukazuje na sposobnost razgradnje hidrokarbonskih ili hlorisanih komponenata pod anoksičnim uslovima kao što su toluen, naftalen, alkani, trihloreteni. U našim istraživanjima na zagađenim lokacijama osim *Alphaproteobacteria* prisutne su i SRB bakterije. Nalaz upućuje na to da ciklus sumpora ima važnu ulogu na lokacijama zagađenim hidrokarbonskim jedinjenjima što potvrđuju i istraživanja Korlević i sar. (2015). Većina zajednica na nivou familija pozitivno je korelisana sa ukupnim fosforom što može ukazati i na pojavu eutrofikacije.

Multivarijantna CCA analiza pokazuje da PAH i PCB naročito na SBL poziciji utiču na strukturu zajednica, smanjenje diverziteta i bogatstva zajednica, dok amonijak uglavnom ima veći efekat na sediment lokacije BDV. Veliki uticaj PAH jedinjenja kao potencijalne pokretače izmjena u kompoziciji bakterijskih zajednica potvrđuju i druge studije kao što su Sun i sar. (2012) Wang i sar. (2015), Quero i sar. (2015), Vitali i sar. (2019). Shodno istraživanjima Godoy - Lozano i sar., (2018) faktori spoljašnje sredine oblikuju bakterijsku zajednicu i u Meksičkom zalivu.

Takođe naglašava da se promjene u koncentraciji aromatičnih hidrokarbonskih jedinjenja reflektuju na jasnu sukcesiju mikrobnih zajednica.

Na globalnom nivou (299 uzoraka sa 40 lokacija) prisustvo i odsustvo kiseonika kao i TOC identifikovani su kao ključni faktori spoljašnje sredine za oblikovanje taksonomske kompozicije i diverziteta (Hoshino i sar., 2020). Novija istraživanja (Lu i sar., 2019, Di Cesare i sar., 2020; Lee i sar., 2020; Rodriguez i sar., 2021) opisuju uticaj različitih parametara na mikrobnii diverzitet u obalnim područjima koji su pod antropogenim uticajem. U našim istraživanjima, PAH, TOC i muljeviti sadržaj sedimenta su ključni pokretači izmjena bakterijskih zajednica u sedimentima Crnogorske obale.

U zalivu Pule sa istorijom zagađenja od preko 100 godina, dubina vodenog stuba kao i nutrijenti (ugljenik i azot) utiču na diverzitet bakterijskih zajednica (Di Cesare i sar., 2020). Slični rezultati su prikazani i u sjeverozapadnom dijelu Meksika (Rodriguez i sar., 2021) gdje ističu veliki uticaj temperature, kiseonika i aluminijuma. U sedimentima zapadne obale Južne Koreje, na izmjenii bakterijskih zajednica u najvećoj mjeri utiče PAH, alkifenoli, kadmijum i živa (Lee i sar., 2020).

U našim istraživanjima koncentracija ukupnog organskog ugljenika imala je slabiji efekat na strukturu zajednica u odnosu na hidrokarbonska jedinjenja. Peng i sar. (2015) ističu TOC kao glavni determinatni faktor u varijacijama mikrobnih zajednica ali ne uzimaju u obzir PAH i PCB u svojim istraživanjima. Međutim sve studije ističu da multipni stresori vode smanjenju diverziteta zbog nemogućnosti individua da razviju toleranciju na polutante (Obi i sar, 2016; Vitali i sar.2019).

Iako su najveće koncentracije PAH i PCB izmjerene na lokacijama SBL i PMN, bakterijske zajednice se karakterišu različitom kompozicijom i značajno različitom

frekvencijom gena uključenih u degradaciju aromatičnih jedinjenja i ABC transportnih proteina.

Ovo se može objasniti dominacijom PAH velike molekulske mase (HPAHs > 3 prstena) na SBL lokaciji, što omogućava duži opstanak polutanata i rezistenciju ka biodegradaciji (Ghosal i sar., 2016). Evidentno je da na bakterijske zajednice na PMN lokaciji utiču faktori koji nisu izmjereni u ovoj studiji. Različiti tipovi sredine morskog sedimenta i zagađenja daju različit odgovor na diverzitet mikrobnih zajednica i njihovu aktivnost. Stoga, interakcija različitih uslova u sličnim sredinama (staništima) može dati specifičan odgovor na mikrobiološkom nivou. Skoro je nemoguće izmjeriti sve faktore koji utiču na mikrobne zajednice.

Fizičko-hemijske karakteristike jedinjenja kao i fizičke, hemijske i biološke osobine samog sedimenta imaju veliki uticaj na kapacitet degradacije aromatičnih jedinjenja kod mikroorganizama. Takođe brojni faktori kao što su temperatura, pH, raspoloživost nutrijenata, sadržaj kiseonika utiču na rast mikroorganizama koji imaju sposobnost bioremedijacije. Mikroorganizmi koriste azot, fosfor, kalijum i gvožđe za normalan metabolizam i rast, tako da će na lokacijama sa većim sadržajem nutrijenata mogućnost bioremedijacije biti veća.

Ipak treba napomenuti da sadržaj nutrijenata iznad dozvoljenih vrijednosti može inhibirati proces bioremedijacije (Ghosal i sar., 2016). Postoji pozitivna veza između relativne abundance gena povezanih sa razgradnjom polutanata i efikasnošću bioremedijacije. Takođe može se desiti da geni povezani sa razgradnjom polutanata mogu biti prisutni ali nisu otključani (Ghosal i sar., 2016).

Uzimajući u obzir PCB jedinjenja u našim istraživanjima, samo dva gena sa nižom frekvencijom povezana su sa bifenil degradacijom kodirajući bifenil 2,3 -dioksigenazu i takođe gene koji su povezani sa hloralkan i hloralken degradacijom, ali nema značajne razlike u frekvenciji gena između uzoraka. Za razliku od anaerobne stimulacije PCB degradacije u sedimentima, koja još nije dovoljno razjašnjena aerobna stimulacija bioremedijacije je u upotrebi. Mikroorganizmi koriste kiseonik za raskidanje veza PCB sadržaja. Bifenil je primarni produkt koji podržava ko-metabolizam PCB. Tokom aerobne degradacije benzenov prsten sa manje atoma hlora se razlaže. Ovaj proces uključuje nekoliko gena grupe *bph* i to: *bphA* (dioksigenaza bifenil prstena), *bphB* (dehidrogenaza), *bphC* (dioksigenaza prstena). (Jing i sar., 2018). *bphA* gen je odgovoran za dioksigenaciju

bifenil prstena uz formiranje dihidrodiola. *bphB* gen učestvuje u oksidaciji bifenil-2,3-dihidrodiola u 2,3 – dihidroksibifenil. *bphC* je odgovoran za rascjep bifenil prstena formirajući fenilkatehol (Jing i sar, 2018).

Utvrđena frekvencija gena u našoj studiji sa sposobnošću razlaganja aromatičnih komponenti povezani su sa enzimima oksidoreduktaze kao što su salicilat hidrolaza, p-hidroksibenzoat 3-monooksigenaza, hidrolaza 3-oksoadipat enol-laktonaza, katehol 2,3-dioksigenaza, 3,4 – dihidroksibenzoat sa najvećom frekvencijom na SBL lokaciji.

Pomenuti nalazi upućuju na aerobnu degradaciju na SBL lokaciji (Ghosal i sar., 2016). Prvi korak aerobne bakterijske degradacije PAHa je hidroksilacija aromatičnog prstena enzimima dioksigenaze uz formiranje cis-dihidrodiola, koji se rearomatizuje u intermedijarni diol djelovanjem dehidrogenaze. Ovi diol intermedijerni proizvodi se mogu razložiti cijepanjem intradiol ili extradiol dioksigenaza samog prstena vodeći ka formiranju novih intermedijernih proizvoda kao što je katehol koji se konvertuje u Ciklus trikarboksilnih kiselina – TCA (Eng. tricarboxylic acid cycle) (Ghosal i sar., 2016).

Bisht i sar. (2015) navode da su enzimi uključeni u degradaciju PAHa uglavnom oksigenaze, dehidrogenaze, fosfataze, lignolitički enzimi i da su aktivni na optimalnim temperaturama.

Jedna od značajnih negativnih korelacija je prikazana između menakinona i demetilmenakinona sa PAH i PCB, a na lokaciji SBL ovi metabolički putevi su redukovani. Menakinoni imaju ključnu ulogu u prokariotskom respiratornom elektronskom transportu funkcionišući kao nosač elektrona u citoplazmatskoj membrani. Pored uloge u mikrobnom disanju pokazuju i antioksidativna svojstva gdje mogu učestvovati u zaštiti ćelijskih membrana od oksidacije lipida (Walther i sar., 2013; Boersch i sar., 2018).

Geni koji kodiraju ABC transportne proteine povezani su sa biotinom, ureom, glicerolom, polisaharidima, fosfatnim transportnim sistemom, metionin transportom sa najvećom frekvencijom gena na SBL lokaciji da bi bakterijske zajednice ispunile metaboličke zahtjeve za rast i opstanak u zagađenom sedimentu. Transmembranski proteini koriste energiju vezivanja i hidrolize adenzin trifosfata (ATP) za obavljanje specifičnih bioloških procesa. Oni transportuju širok opseg supstrata kroz ekstra- i intracelularne membrane uključujući metaboličke produkte, lipide, sterole (Jones i George, 2004).

Uprkos evidentnom zagađenju, nema značajnijeg uticaja polutanata na bogatstvo vrsta na lokaciji PMN. Ovo se može objasniti činjenicom da polutanti mogu doprinjeti proliferaciji više tolerantnih vrsta zamjenjujući one manje tolerantne ne utičući time na diverzitet (Gillian i sar., 2005).

Bitno je napomenuti da u naučnim istraživanjima odabir molekularne metode utiče na dobijanje različitih rezultata npr. fingerprint metoda opisuje samo dominantne vrste dok NGS dozvoljava identifikaciju i dominantnih i rijetkih vrsta (Bent i sar., 2007).

Naši rezultati potvrđuju visoku povezanost bakterijskih zajednica sa faktorima spoljašnje sredine u najvećoj mjeri sa PAH, TOC i glinovitim sadržajem sedimenta. PAH i PCB jedinjenja najveći uticaj imaju na sediment SBL lokacije, što zaslužuje dalje ispitivanje i monitoring u cilju izolacije potencijalnih bakterijskih zajednica zaslužnih za biodegradaciju i bioremedijaciju.

7.ZAKLJUČCI

- Bakterijske zajednice na lokacijama SBL, BDV i ADB formiraju odvojene klastere.
- Ukupni PAH, TOC i glinoviti sadržaj sedimenta statistički imaju najveći uticaj na bakterijske zajednice
- SBL i PMN lokacije su ocijenjene kao visoko zagađene (najveći sadržaj PAH i PCB), međutim pokazuju različitu kompoziciju zajednica i značajno različite frekvencije gena uključene u razgradnju aromatičnih jedinjenja
- Ukupan PAH i PCB imaju najveći uticaj na bakterijske zajednice na SBL lokaciji, što se manifestuje i do tri puta povećanom abundancom *Alphaproteobacteria*. Na ovoj lokaciji zabilježene su i najniže vrijednosti diverziteta zajednica i bogatstva vrsta
- Bakterijske zajednice koje pripadaju BRC1, *Dadabacteria* (iako nisko abundantne) pokazuju statistički značajnu korelaciju sa PAH i PCB na lokaciji SBL što ukazuje na njihovu otpornost i potencijalnu mogućnost razgradnje aromatičnih jedinjenja
- Sulfat redukujuće bakterije (SRB) kojoj pripada familija *Syntrophobacteraceae* kao i *Thermoanaerobaculaceae* najveću abundancu pokazuju u unutrašnjem i središnjem dijelu Bokokotorskog zaliva. U ovom dijelu zaliva zabilježene su i najveće vrijednosti TOC, TN i TP sadržaja
- *Woeseiaceae* (*Steroidobacterales*) koje najveću brojnost dostižu na estuarijnom području ADB, visoko su korelisani sa TOC sadržajem. Ova lokacija ocijenjena je kao najmanje zagađena čemu doprinosi pjeskovita struktura sedimenta
- *Desulfobulbaceae* najveću brojnost pokazuju na BDV lokaciji i one su negativno korelisane sa TP
- Najveću korelaciju sa PAH i PCB bakterijske zajednice pokazuju na nivou razdjela i klase. Na nivou porodice, najveći broj zajednica korelisan je sa TP, što može biti znak eutrofikacije
- Funkcionalne sposobnosti bakterija povezane sa razgradnjom aromatičnih jedinjenja pokazuju značajne razlike između SBL lokacije u odnosu na ostale ispitane pozicije, pokazujući da na mikrobne zajednice ne utiče samo PAH i PCB nego i nutrijenti kao i granulometrijske kompozicije sedimenta.

- Transportni sistemi proteina povezani su sa biotinom, ureom, glicerol-fosfatnim transportom, polisaharidima, metionin transportom pokazuju najveću frekvenciju gena na SBL lokaciji da bi bakterijske zajednice ispunile metaboličke zahtjeve za rast i opstanak u zagađenom sedimentu. Ovi transportni procesi pokazuju značajne korelacije sa ispitivanim hemijskim parametrima posebno sa PAH i PCB.

8. LITERATURA

Abed, R. M., Safi, N. M., Köster, J., de Beer, D., El-Nahhal, Y., Rullkötter, J., Garcia-Pichel, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1674–1683.

Acosta-González, A., Rosselló-Móra, R., Marqués, S. (2013). Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology*, 15(1), 77-92.

Ager, D., Evans, S., Li, H., Lilley, A. K., Van Der Gast, C. J. (2010). Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 12, 670-678.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 215, 403–410.

Amann, R.I., Ludwig, W, Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.

Amer. R. A., Fatah, Y.R.A. (2014). Hydrocarbonoclastic marine bacteria in Mediterranean Sea, El-Max, Egypt: isolation, identification and site characterization. *Jökull Journal*, 64(4), 223-249.

Barić, A., Vančina, F., Škarica, A. (2009). Izvještaj o strateškoj procjeni uticaja na životnu sredinu, Ministarstvo za ekonomske razvoj Crne Gore. 48pp.

Barns, S. M., Cain, E. C., Sommerville, L., Kuske, C. R. (2007). *Acidobacteria* phylum sequences in uranium-contaminated subsurface sediments greatly expand the known diversity within the phylum. *Applied and Environmental Microbiology*.

Baumard, P., Budzinski, H., Michon, Q., Garrigues, P., Burgeot, T., Bellocq, J. (1998) Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from mussel and sediment records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 47(1), 77-90.

Beolchini, F., Ubaldini, S., Passariello, B., Gül, N., Türe, D., Vegliò, F., Danovaro, R. and Dell'Anno, A. (2007). Bioremediation of dredged sediments polluted by heavy metals. In *Advanced materials research*, 20, 307-310). Trans Tech Publications Ltd.

Bihari, N., Fafand, M., Hamer, B., Kralj-Bilen, B. (2006). PAH content, toxicity and genotoxicity of coastal marine sediments from the Rovinj area, Northern Adriatic, Croatia. *Science of the Total Environment*, 366(2-3), 602-611.

Bisht, S., Pandey, P., Bhargava, B., Sharma, S., Kumar, V., Sharma, K.D. (2015) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 7-21.

Boersch, M., Rudrawar, S., Grant, G. Zunk, M. (2018). Menaquinone biosynthesis inhibition: a review of advancements toward a new antibiotic mechanism. *RSC advances*, 8(10), 5099-5105.

Bortoluzzi, G., Giglio, F., Ligi, M., Del Bianco, F., Ferrante, V., Gasperini, L., Ravaioli, M. , 2016. Morphobathymetry of Boka Kotorska Bay, in: Joksimović, A., Đurović, M., Semenov, A., Zonn, I., Kostianoy, A. (Eds.), *The Boka Kotorska Bay Environment. The Handbook of Environmental Chemistry*, 54. Springer International Publishing Switzerland, pp.69-88.

Boitsov, S., Petrova, V., Jensen, H.K., Kursheva, A., Litvinenko, I., Klungsøyr, J. (2013). Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments from southern and northern areas of the Norwegian continental shelf. *Marine environmental research*, 87, 73-84.

Boughner, L.A. and Singh, P. (2016). Microbial Ecology: Where are we now? *Postdoc journal: a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs*, 4(11), 3.

Camargo, J. A., Alonso, Á. (2006). Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment. *Environment international*, 32(6), 831-849.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336.

Cardellicchio, N., Buccolieri, A., Giandomenico, S., Lopez, L., Pizzulli, F., Spada, L. (2007). Organic pollutants (PAHs, PCBs) in sediments from the Mar Piccolo in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Marine Pollution Bulletin* 55 (10-12), 451-458.

Cederlund, H., Wessen, E., Enwall, K., Jones, C. M., Juhanson, J., Pell, M., Philippot, L., Hallin, S. (2014). Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. *Applied Soil Ecology* 84, 62–68.

Cifuentes, A., Antón, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R.A., Rodriguez-Valera. (2000). Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1715-1719.

Cravo-Laureau, C., Duran, R. (2014). Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: contribution of experimental ecology in the omics'era. *Frontiers in microbiology*, 5, 39.

Dabović, Đ. (2007). Prostorno ekološki problem opštine Ulcinj. 64p.

Defforey, D., Paytan, A. (2018). Phosphorus cycling in marine sediments: advances and challenges. *Chemical Geology*, 477, 1-11.

Degnan PH, Ochman H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME Journal*, 6, 183–194.

Del Bianco, F., Gasperini, L., Giglio, F., Bortoluzzi, G., Kljajić, Z., Ravaioli, M. (2014). Seafloor morphology of the Montenegro/N.Albania Continetal Margin (Adriatic Sea, Central Mediterranean). *Geomorphology* 226, 202-216.

Di Cesare, A., Pjevac, P., Eckert, E., Cukrov, N., Miko Šparica, M., Corno, G., Orlić, S. (2020). The role of metal contamination in shaping microbial communities in heavily polluted marine sediments. *Environmental Pollution*. 265, 114823.

Dong, X., Greening, C., Bröls, T., Conrad, R., Guo, K., Blaskowski, S., Kaschani, F., Kaiser, M., Laban, N.A., Meckenstock, R.U. (2018). Fermentative *Spirochaetes* mediate necromass recycling in anoxic hydrocarbon-contaminated habitats. *ISME Journal*, 12, 2039–2050.

Douglas, G.M., Maffei, V.J., Zaneveld, J.R., Yurgel, S.N, Brown, J.R., Taylor, C.M., Huttenhower, C., Langille, M.G.I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology* 38, 685–688.

Drakulović, D., Pestorić, B., Kraus, R., Ljubimir, S., Krivokapić, S. (2016). Phytoplankton community and trophic state in Boka Kotorska Bay, in Joksimović A., Đurović M., Semenov A., Zonn I., Kostianoy A. (Eds) The Boka Kotorska Bay Environment. The Handbook of Environmental Chemistry, 54 . Ed. Springer, pp.169-201.

Duran, R., Cravo-Laureau, C. (2016). Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(6), 814-830.

Dykstra, S., Bischof, K., Fuchs, B.M., Hoffmann, K., Meier, D., Meyerdierks, A., Pjevac, P., Probandt, D., Richter, M., Stepanauskas, R. and Mußmann, M. (2016). Ubiquitous *Gammaproteobacteria* dominate dark carbon fixation in coastal sediments. *The ISME journal*, 10(8), 1939-1953.

Dyksma, S., Lenk, S., Sawicka, J. E., Mußmann, M. (2018). Uncultured *Gammaproteobacteria* and *Desulfobacteraceae* account for major acetate assimilation in a coastal marine sediment. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3124.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27 (16), 2194-2200

Edlind, A. 2007. Microbial diversity in Baltic Sea sediments. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural sciences. 36pp.

Eichorst, S. A., Kuske, C. R., Schmidt, T. M. (2011). Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum acidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 586–596.

EPA 3051A (2007). Microwave assisted acid digestion of sediments sludges, soils and oils, 30p.

EPA, 3660B (1996). Sulfur cleanup. <https://www.epa.gov/hw-sw846/sw-846-test-method-3660b-sulfur-cleanup>.

EPA. 2014. Method 8270E (SW-846): Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS). Washington, DC. pp64.

Frena, M., Bataglion, G. A., Sandini, S. S., Kuroshima, K. N., Eberlin, M. N., Madureira, L. A. (2017). Distribution and Sources of Aliphatic and Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of Itajaí-Açu Estuarine System in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(4), 603-614.

Frignani, M., Bellucci, L. G., Carraro, C., Racanelli, S. (2001). Polychlorinated biphenyls in sediments of the Venice Lagoon. *Chemosphere* 43(4-7), 567-575.

Gao, W., Yin, X., Mi, T., Zhang, Y., Lin, F., Han, B., Zhao, X., Luan, X., Cui, Z, Zheng, L. (2018). Microbial diversity and ecotoxicity of sediments 3 years after the Jiaozhou Bay oil spill. *AMB Express*, 8(1), 79.

Ghosal, D., Chakraborty, J., Khara, P., Dutta, T.K. (2010). Degradation of phenanthrene via meta-cleavage of 2-hydroxy-1-naphthoic acid by *Ochrobactrum* sp. Strain PWTJD. *FEMS Microbiology Letters* 313, 103–110.

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., Ahn, Y. (2016). Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1369.

Gillan, D. C., Danis, B., Pernet, P., Joly, G., Dubois, P. (2005). Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 679-690.

Giovannelli, D., Molari, M., d'Errico, G., Baldrighi, E., Pala, C., Manini, E. (2013). Large-Scale Distribution and Activity of Prokaryotes in Deep-Sea Surface Sediments of the Mediterranean Sea and the Adjacent Atlantic Ocean, *PLoS ONE* 8(8), e72996

GIPME. (2000). Guidance on Assessment of Sediment Quality, Ed. International Maritime Organization, London, 439/00, 19pp.

Glenn, T. C. (2011). Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular ecology resources*, 11(5), 759-769.

Godoy-Lozano, E. E., Escobar-Zepeda, A., Raggi, L., Merino, E., Gutierrez-Rios, R. M., Juarez, K., Segovia, L., Licea-Navarro, A.F., Gracia, A., Sanchez-Flores, A., Pardo-Lopez, Lj. (2018). Bacterial diversity and the geochemical landscape in the southwestern Gulf of Mexico. *Frontiers in microbiology* 9, 2528.

Graham, E.D., Tully, B.J. (2020). Marine *Dadabacteria* exhibit genome streamlining and phototrophy-driven niche partitioning. *bioRxiv*.

Gvozdenović, S. (2020). Integralni multi-trofički uzgoj dagnje (*Mytilus galloprovincialis* L.) i kamenice (*Ostrea edulis* L.) sa ribom u Bokokotorskom zalivu. Doktorska disertacija. Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet. Studijski program biologija. 191pp.

Halpern, B. S., Walbridge, S., Selkoe, K. A., Kappel, C.V., Micheli, F., D'Agros, C. (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science*, 319 (5865), 948-952.

Hicks, N., Liu, X., Gregory, R., Kenny, J., Lacaci, A., Lenzi, L., Paterson, D.M., Duncan, K.R. (2018). Temperature driven changes in benthic bacterial diversity influences biogeochemical cycling in coastal sediments. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1730.

Hosino, T., Doi, H., Uramoto, G., Wormer, L., Adhikari, R., Xiao, N., Morono, Y., D Hondt, S., Hinrichs, K-U., Inagaki, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *PNAS* 44: 27597-27597.

Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJ. (2001). Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied Environmental Microbiology*. 4399-4406.

Hussar, E., Richards, S., Lin, Z. Q., Dixon, R. P., Johnson, K. A. (2012). Human health risk assessment of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of Chattanooga, Tennessee, USA. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(9), 5535-5548.

IAEA, Environment Laboratories, Marine Environmental Study Laboratory. (2015). Med Pol – Trace organic contaminants training course. Monaco. 83pp.

International Agency for Research on Cancer. (2006). List of all agents evaluated to date. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.

ISO /TS 13137. (2001). Characterization of waste - Determination of total organic carbon (TOC) in waste, sludges and sediments.

ISO/TS 14256-1. (2003). Soil quality – Determination of nitrate, nitrite and ammonium in field-moist soils by extraction with potassium chloride solution – Part 1: Manual method.

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., Reddy, D.N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787-8803.

Javno preduzeće za upravljanje morskim dobrom. (2017). Informacija o stanju u luci Budva (Presjek stanja u luci Budva / Poslovanje Dukley Marine / Problemi u funkcionisanju i njihovo prevazilaženje). Ministarstvo održivog razvoja i turizma. 10pp.

Jing, R., Fusi, S. Kjellerup, B.V. (2018). Remediation of polychlorinated biphenyls (PCBs) in contaminated soils and sediment: state of knowledge and perspectives. *Frontiers in Environmental Science* 6, 79.

Jokanović, S., Huter, A., Orlić, S. (2016). Bacterial diversity of the Boka Kotorska Bay, in: Joksimović, A., Đurović, M., Semenov., A., Zonn, I., Kostianoy, A. (Eds.), *The Boka Kotorska Bay Environment. The handbook of Environmental Chemistry*, 54. Springer International Publishing Switzerland, pp.151-168.

Jones, P.M. and George, A.M. (2004). The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(6), 682-699.

Kadnikov, V.V., Mardanov, A.V., Beletsky, A.V., Rakitin, A.L., Frank, Y.A., Karnachuk, O.V., Ravin, N.V. (2019). Phylogeny and physiology of candidate phylum BRC1 inferred from the first complete metagenome -assembled genome obtained from deep subsurface aquifer. *Systematic and Applied Microbiology*, 42.

Karaman, G., Gamulin-Brida, H. (1970) Contribution aux recherche des biosensors benthiques du golfe de Boka Kotorska. *Studia Marina*, 4, 3-43.

Kielak, A. M., Barreto, C. C., Kowalchuk, G. A., van Veen, J. A., Kuramae, E. E. (2016). The ecology of *Acidobacteria*: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in Microbiology*, 7, 744.

Kim, B.R., Shin, J., Guevarra, R.B., Lee, J.H., Kim, D.W., Seol, K.H., Lee, J.H., Kim, H.B. and Isaacson, R.E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(12), 2089-2093.

Kirchman DL. (2008). Introduction and overview. in: Kirchman, DL (prir.), *Microbial Ecology of the Oceans* (Ed.) Wiley-Blackwell, New Jersey. pp.1-26.

Kirchman, D.L. (2002). The ecology of Cytophaga–Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS microbiology ecology*, 39(2), 91-100.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glöckner, F.O. (2012). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), pp.e1-e1.

Klajić, Z., Marković, S., Žmukić, J., Mitrić, M., Castelli A., Pestorić, B., Drakulović, D. (2012). Monitoring obalnog mora Crne Gore. Zbornik radova, 41 konferencija o aktuelnim problemima korišćenja i zaštite voda. VODA 2012, 207-2014.

Korlević, M. (2015). Detaljna analiza bakterijske raznolikosti Jadranskog mora. Doktorski rad. Sveučilište u Zagrebu. Prirodoslovno – matematički fakultet. 106pp.

Korlević, M., Zucko, J., Najdek - Dragić, M., Blažina, M., Pustijanac, E., Vojvoda Željko T., Gacesa, R., Baranasic, D., Starčević, A., Diminić, J., Long, P.F., Cullum, J., Hranueli, Orlić, S. (2015). Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Systematic and Applied Microbiology*, 38, 189-197.

Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A, Delgardio, J., Norton, N., Hazen, T.C., Huttel, M. (2011). Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 7962-7974.

Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D. (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing

amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and environmental microbiology*, 79(17), 5112-5120.

Krivokapić, S. (2008): Chlorophyll *a* as biomass indicator in the Boka Kotorska Bay. Proceeding of BALWOIS 2008 (27-31 May 2008, Ohrid, Macedonia).

Krivokapić, S., Pestorić, B., Bosak, S. (2011): Trophic state of Boka Kotorska Bay (southeastern Adriatic Sea). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(8), 1960 – 1969.

Krivokapić, S., Bosak, S., Viličić, D., Kušpilić, G., Drakulović, D., Pestorić, B. (2018). Algal pigments distribution and phytoplankton group assemblages in the coastal transitional environment–Boka Kotorska Bay (Southeastern Adriatic Sea). *Acta Adriatica*, 59(1), 35-49.

Krstulović, N., M. Šolić. (2006). Mikrobiologija mora. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split. 350 pp.

Kummu, M., Guillaume, J. H. A., de Moel, H., Eisner, S., Flörke, M., Porkka, M., Siebert, S., Veldkamp, T.I.E, Ward, P. J. (2016). The world's road to water scarcity: shortage and stress in the 20th century and pathways towards sustainability. *Scientific Reports* 6, 38495.

Ladakis, M., Dassenakis, M., Pantazidou, A. (2006). Nitrogen and phosphorus in coastal sediments covered by cyanobacteria mats. *Journal of soils and sediments*, 6(1), 46-54.

Lee, A.H., Lee, J., Hong, S., Kwon, B.O., Xie, Y., Giesy, J.P., Zhang, X., Khim, J.S. (2020). Integrated assessment of west coast of South Korea by use of benthic bacterial community structure as determined by eDNA, concentrations of contaminants, and in vitro bioassays. *Environment International*, 137, 105569.

Lepetić, V. (1965). Sastav i sezonska dinamika ihtiofentosa i jestivih avvertebrata u Bokokotorskom zalivu i mogućnost njihove eksploatacije, *Studia Marina*, 1, 3-127.

Louvado, A., Gomes, N.C.M., Simões, M.M.Q., Almeida, A, Cleary, D.F.R., Cunha, A. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons in deep sea sediments: Microbe -pollutant interactions in a remote environment. *Science of the Total Environment* 526, 312-328.

Lu, M., Luo, Z, Jiao, JJ., Li, H., Wang, X., Gao, J., Zhang, X., Xiao. (2019). Nutirents and heavy metals mediate the distribution of microbial community in the marine sediments of the Bohai Sea, China. *Environmental Pollution*, 255,113069.

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C. and Dunthorn, M. (2015). Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 3, p.e1420.

Mahmoudi, N., Robeson, M. S., Castro, H. F., Fortney, J. L., Techtmann, S.M, Joyner, D.C., Paradis, C.J., Pfiffner, S.M., Hazen, T.C. (2015). Microbial community composition and diversity in Caspian Sea sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(1), 1.

Mandić, S. (2001). Bioekološki potencijali priobalnog mora Crne Gore. U: Istraživanje, korišćenje I zaštita litoralnog područja Južnog Jadrana. In: Mandić S (ed) Studija: Projekat OSI-267. Institut za biologiju mora, Kotor, pp.11-17.

Mandić, S., Radović, I., Radović, D. (2016). Physical and Geographical description of the Boka Kotorska Bay, in: Joksimović, A., Đurović, M., Semenov, A., Zonn, I., Kostianoy, A. (Eds), The Boka Kotorska Bay Environment. The Handbook of Environmental Chemistry, 54. Springer International Publishing Switzerland, pp.43-67.

Mardis, E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. Annual review of genomics and human genomics, 9,387-402.

Matturro, B., Ubaldi, C., Grenni, P., Caracciolo, A. B., Rossetti, S. (2016). Polychlorinated biphenyl (PCB) anaerobic degradation in marine sediments: microcosm study and role of autochthonous microbial communities. *Environmental. Science and. Pollution Research*, 23(13), 12613-12623.

Merhaby, D., Net, S., Halwani, J., Ouddane, B. (2015). Organic pollution in surficial sediments of Tripoli harbour. Lebanon. *Marine Pollution Bulletin*, 93, 284–293.

Milojević, Ž.B. (1953). Boka Kotorska. Zbornik radova Geografskog instituta SAN. Beograd, 120-145.

Mohd Ali, S.A., Yep, Y.M. (2016). Petroleum hydrocarbon in mud clam (*Polymesoda erosa*) and its ambient medium in the coastal area of Putatan and Tuaran, Sabah. *Transactions on Science and Technology*, 3(1-2), 218-226.

Munn, C. (2011). Marine microbiology. Ecology and applications. 2nd edition. Garland Science. Taylor&Francis Group. New York and London. 363p.

Murtagh, F., Legendre, P. (2014). Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? *Journal of classification*, 31, 274-295.

Narančić, T. (2012). Metabolička raznovrsnost bakterija izolovanih iz površinskog rječnog sedimenta pod uticajem petrohemijskih efluenata: *Pseudomonas* sp.TN301 kao proizvođač polihidroksialkanoata. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu. Biološki fakultet. 123pp.

Navarrete AA, Diniz TR, Braga LPP, Silva GGZ, Franchini JC, Rossetto R, Edwards, R.A., Tsai, S.M. (2015). Multianalytical approach reveals potential microbial indicators in soil for sugarcane model systems. *PLoS ONE* 10(6): e0129765.

Nealson, K.H. (1997). Sediment bacteria: Who's There, What Are They Doing, and What's New? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 5, 403–34.

Nie Y, Tang YQ, Li Y, Chi, C-Q., Cai, M., Wu, X-L. (2012). The Genome Sequence of *Polymorphum gilvum* SL003B-26A1T Reveals Its Genetic Basis for Crude Oil Degradation and Adaptation to the Saline Soil. *PLOS ONE* 7(2): e31261.

Nogales, B., Lanfranconi, M. P., Piña-Villalonga, J. M., Bosch, R. (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*. 35(2), 275-298.

Obi, C. C., Adebuseye, S. A., Ugoji, E. O., Ilori, M. O., Amund, O. O., Hickey, W. J. (2016). Microbial communities in sediments of Lagos lagoon, Nigeria: elucidation of community structure and potential impacts of contamination by municipal and industrial wastes. *Frontiers in microbiology*, 7, 1213.

Oksanen, J., Blanchet, G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., Mc Glinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., M. Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H. (2019). Community ecology Package.
<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>.

Oregaard, G., Sørensen, S. J. (2007). High diversity of bacterial mercuric reductase genes from surface and sub-surface floodplain soil (Oak Ridge, USA). *The ISME journal*, 1(5), 453.

Paerl, H. W., Dyble, J., Moisander, P. H., Noble, R. T., Piehler, M. F., Pinckney, J. L., Steppe T.F., Twomey, L., Valdes L.M. (2003). Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiology Ecology*, 1561, 1–14.

Paliaga, P., Felja, I., Budiša, A., Ivančić, I. (2019). The impact of a fish cannery wastewater discharge on the bacterial community structure and sanitary conditions of marine coastal sediments. *Water*, 11, 2566.

Pankratov, T. A., Kirsanova, L. A., Kaparullina, E. N., Kevbrin, V. V., Dedysch, S. N. (2012). *Telmatobacter bradus* gen. nov., sp nov., a cellulolytic facultative anaerobe from subdivision 1 of the Acidobacteria, and emended description of *Acidobacterium capsulatum* Kishimoto et al., 1991. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 430–437.

Paul, D., Pandey, G., Meier, C., van der Meer, J. R., Jain, R. K. (2006). Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation. *FEMS Microbiology. Ecology*, 57, 116–127.

Peng, M., Zi, X., Wang, Q. (2015). Bacterial community diversity of oil-contaminated soils assessed by high throughput sequencing of 16S rRNA genes. *International journal of environmental research and public health*, 12(10), 12002-12015.

Persson, J.A. (2008). Handbook for Kjeldahl digestion. A recent review of the classical method with improvements developed by FOSS.CA Anderson. Malmoe, Sweden Press.80pp.

Petković, S., Sekulić, G. (2018). Erosion and sedimentation processes in the Bojana River Delta at the Adriatic Sea. *Journal of coastal conservation*, 23(1), 39-47.

Pinnaka, A.K., Tanuku, N.R.S. (2014). The family *Cyclobacteriaceae*, In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds), *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Pohlner, M., Dlugosch, L., Wemheuer, B., Mills, H., Engelen, B., Kiel, Reese, B. (2019). The Majority of Active *Rhodobacteraceae* in marine sediments belong to uncultured Genera: A Molecular Approach to Link Their Distribution to Environmental Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 10, 659.

Polymenakou, P.N., Bertilsson, S., Tselepides, A., Stephanou, E.G. (2005). Links between geographic location, environmental factors and microbial community composition in sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Microbiology Ecology*, 49, 367–378.

Probandt, D., Eickhorst, T., Ellrott, A., Amann, R., Knittel, K. (2018). Microbial life on a sand grain: from bulk sediment to single grains. *ISME Journal*, 12(2), 623-633.

Quero, G. M., Cassin, D., Botter, M., Perini, L., Luna, G. M. (2015). Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Frontiers in microbiology* 6, 1053.

Radjičić, B. (2005). Vode Crne Gore. Filozofski fakultet u Nikšiću, Institut za geografiju, 390p.Nikšić

Regner D (2001) Biološke karakteristike, zaštita i unapređenje kvaliteta mora, str. 18-41. U: Istraživanje, korišćenje i zaštita litoralnog područja Južnog Jadrana. In: Mandić S (ed) Studija: Projekat OSI-267. Institut za biologiju mora, Kotor.

Reyes, C., Schneider, D., Lipka, M., Thürmer, A., Böttcher, M. E., Friedrich, M. W. (2017). Nitrogen metabolism genes from temperate marine sediments. *Marine Biotechnology*, 19(2), 175-190.

Rodríguez, J., Gallampois, C. M. J., Timonen, S., Andersson, A., Sinkko, H., Haglund, P., Berglund, A.M.M., Ripsyam, M., Figueroa, D., Tyskind, M., Rowe, O. (2018). Effects of organic pollutants on bacterial communities under future climate change scenarios. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2926.

Rodríguez, J., Gallampois, C.M.J., Haglund, P., Timonen, S., Rowe, O. (2021). Bacterial communities as indicators of environmental pollution by POPs in marine sediments. *Environmental Pollution* 268, 115690.

Romano, N.; Zeng, C. (2013). Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: A Review on Factors Influencing their Toxicity, Physiological Consequences, and Coping Mechanisms. *Reviews in Fisheries Science*, 21, 1-21.

Roussiez, V., Ludwig, W., Monaci, A., Probst, J-L., Bouloubassi, I., Buscail, R., Saragoni, G. (2006). Sources and sinks of sediment-bound contaminants in the Gulf of Lions (NW Mediterranean Sea): a multi-tracer approach. *Continental Shelf Research*, 26, 1843–1857.

Sait, M., Hugenholtz, P., Janssen, P. H. (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology* 4, 654–666.

Sánchez-Peinado, M. D. M., González-López, J., Martínez-Toledo, M. V., Pozo, C., Rodelas, B. (2010). Influence of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on the structure of *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Acidobacteria* communities in a soil microcosm. *Environmental Science and Pollution Research*, 17(3), 779-790.

Savicki, L. (1924). Postanak Boke Kotorske. Glasnik Srpskog geografskog društva. Sveska 1. Beograd.

Schlitzer, R. Ocean data view. <https://odv.awi.de> 2018.

Shepard, F.P. (1954). Nomenclature based on sand-silty-clay ratios. *Journal of sedimentary petrology*, 24, 151-154.

Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F. and Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*, 21(8), 1794-1805.

Siles, J. A., Margesin, R. (2018). Insights into microbial communities mediating the bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil from an Alpine former military site. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(10), 4409-4421.

Sipler, R. E., Kellogg, C. T., Connelly, T. L., Roberts, Q. N., Yager, P. L., Bronk, D. A. (2017). Microbial community response to terrestrially derived dissolved organic matter in the coastal arctic. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1018.

Soclo, H. H., Garrigues, P. H., Ewald, M. (2000). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, 40(5), 387-396.

Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M., Herndl, G.J. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(32), 12115-12120.

Spasojević, J. (2015) Karakterizacija bioremedijacionih procesa u sedimentima zagađenim policikličnim aromatičnim ugljovodonicima i procjena biodostupnosti. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Prirodno Matematički Fakultet. Department za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. 133pp.

Stjepčević J, Parenzan P. (1980). Il Golfo delle Bocche di Cattaro - condizioni generali e biocenosi bentoniche con carta ecologica. *Studia Marina*, 9–10, 3–149.

Sun, M. Y., Dafforn, K. A., Brown, M. V., Johnston, E. L. (2012). Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Marine pollution bulletin*, 64(5), 1029-1038.

Sun, M.Y., Dafforn, K.A., Johnston, E.L., Brown, M.V. (2013). Core sediment bacteria drive community response to anthropogenic contamination over multiple environmental gradients. *Environmental microbiology*, 15(9), 2517-2531.

Takizawa, M., Colwell, R.R., Hill, R.T. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied and environmental microbiology*, 59(4), 997-1002.

Thiyagarajan, V., Tsoi, M.M.Y., Zhang, W., Quian, P.Y. (2010). Temporal variation of coastal surface sediment bacterial communities along an environmental pollution gradient. *Marine Environmental research*, 70, 56-64.

UNEP (2006). Mediteranean action plan. Review Meeting of MED POL - Phase III Monitoring Activities. Methods for sediment sampling and analysis. 22pp.

Uprava pomorske sigurnosti, Bar. (2017). Sigurnost i bezbjednost na moru. Ed. Cicero. Cetinje. 50pp.

Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada, K. (1999). Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene *Microbiology*, 145(11), 3305-3315.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2002. Mid-Atlantic Integrated Assessment (MAIA) Estuaries 1997-1998: Summary Report, EPA/620/R-02/003.

Vergin K.L., Beszteri, B., Monier, A., Cameron Thrash, J., Temperton, B., Treusch, A.H., Klipert, F., Worden, A.Z., Giovannoni, S.J. 2013. High-resolution SAR11 ecotype dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series Study site by phylogenetic placement of pyrosequences. *ISME Journal*, 7, 1322–1332.

Vidović, J., Nawrot, R., Gallmetzer, I., Haselmair, A., Tomašových, A., Stachowitsch, M., Vlasta Čosović, V., Zuschin, M. (2016). Anthropogenically induced environmental changes in the northeastern Adriatic Sea in the last 500 years (Panzano Bay, Gulf of Trieste). *Biogeosciences*, 13, 5965–5981.

Vitali, F., Mandalakis, M., Chatzinikolaou, E., Dailianis, T., Senatore, G., Casalone, E., Mastromei, G., Sergi, S., Lussu, R., Arvanitidis, C., Tamburini, E. (2019). Benthic prokaryotic community response to polycyclic aromatic hydrocarbon chronic exposure: importance of emission sources in Mediterranean ports. *Frontiers in Marine Sciences*, 6, 590.

Volkman, J. K., Rohjans, D., Rullkötter, J., Scholz-Böttcher, B. M., Liebezeit, G. (2000). Sources and diagenesis of organic matter in tidal flat sediments from the German Wadden Sea. *Continental Shelf Research*, 20(10-11), 1139-1158.

Walker SA, Whitten LB, Seals GB, Lee WE, Archibong AE, Ramesh A. (2006). Inter-species comparison of liver and small intestinal microsomal metabolism of fluoranthene. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 380–387.

Walther, B., Karl, J.P., Booth, S.L., Boyaval, P. (2013). Menaquinones, bacteria, and the food supply: the relevance of dairy and fermented food products to vitamin K requirements. *Advances in nutrition*, 4(4), 463-473.

Wang, Z., Liu, Z., Xu, K., Mayer, L. M., Zhang, Z., Kolker, A. S., Wu, W. (2014). Concentrations and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface coastal sediments of the northern Gulf of Mexico. *Geochemical Transaction*, 15(1), 2.

Wang, L., Zheng, B., Lei, K. (2015). Diversity and distribution of bacterial community in the coastal sediments of Bohai Bay, China. *Acta Oceanologica Sinica*, 34(10), 122-131.

Wang, K., Ye, X., Zhang, H., Chen, H., Zhang, D., Liu, L. (2016). Regional variations in the diversity and predicted metabolic potential of benthic prokaryotes in coastal northern Zhejiang, East China Sea. *Scientific Reports*, 6, 38709.

Wang, C., Liu, D., Bai, E. (2018). Decreasing soil microbial diversity is associated with decreasing microbial biomass under nitrogen addition. *Soil Biology and Biochemistry* 120, 126–133.

Webster, L., Fryer, R., Davies, I.M., Roose, P., Moffat, C.F. (2009). A proposal for the assessment criteria to be used for the assessment of monitoring data for the concentrations of hazardous substances in marine sediments and biota in the context of the OSPAR QSR. 2010.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York .

Xiong, J., Ye, X., Wang, K., Chen, H., Hu, C., Zhu, J. and Zhang, D. (2014). Biogeography of the sediment bacterial community responds to a nitrogen pollution gradient in the East China Sea. *Applied and environmental microbiology*, 80(6), 1919-1925.

Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Vingarzan, R., Mitchell, R. H., Goyette, D., Sylvestre, S. (2002). PAHs in the fraser river basin: a critical appraisal of PAH ratio as indicators of PAH source and composition. *Organic geochemistry*, 33, 489–515.

Zhang, X., Qu, Y., Ma, Q., Zhang, Z., Li, D., Wang, J., Shen, W., Shen, E. and Zhou, J. (2015). Illumina MiSeq sequencing reveals diverse microbial communities of activated sludge systems stimulated by different aromatics for indigo biosynthesis from indole. *PLoS One*, 10(4), p.e0125732.

Zhang, J., Chen, M., Huang, J, Guo, X., Zhang, Y., Liu, D., Wu, R., He, H., Wang, J. (2019). Diversity of the microbial community and cultivable protease-producing bacteria in the sediments of the Bohai Sea, Yellow Sea and South China Sea. *PloS one*, 14(4).

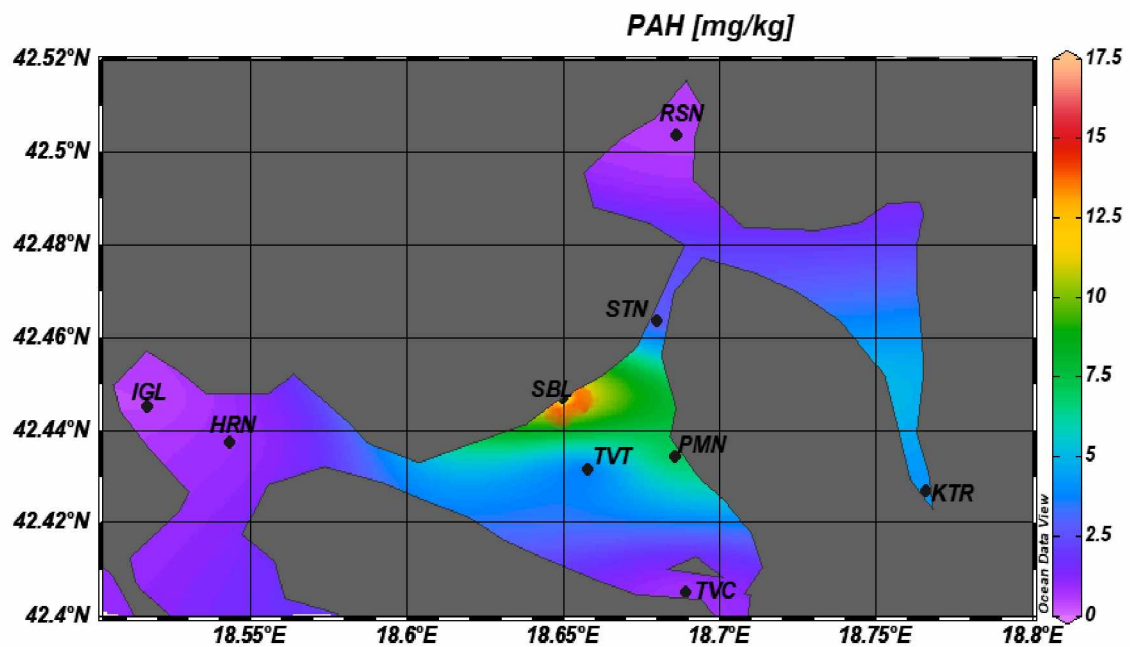
Zhou, J., He, Q., Hemme, C. L., Mukhopadhyay, A., Hillesland, K., Zhou, A., He, Z., Van Nostrand, JD., Hazen, T.C., Stahl, DA., Wall, JD., Arkin AP. (2011). How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), 452.

Zoppini, A., Bongiorno, L., Ademollo, N., Patrolecco, L., Cibic, T., Franzo, A., Melita, M., Bazzaro, M., Amalfitano, S. (2019). Bacterial diversity and microbial functional responses to organic matter composition and persistent organic pollutants in deltaic lagoon sediments, estuarine. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 233, 106508.

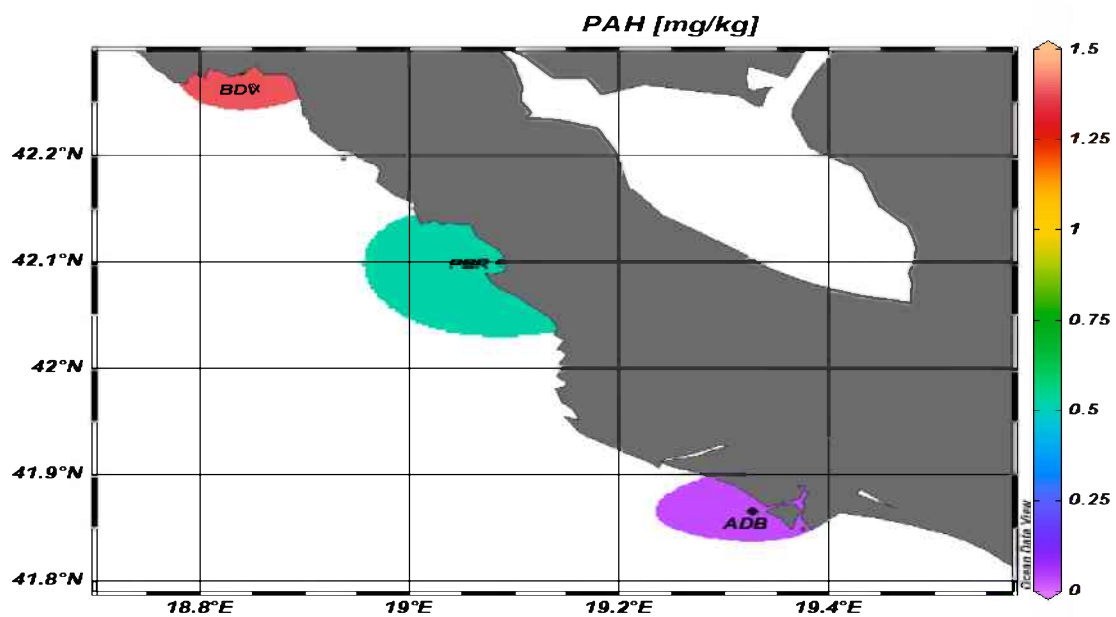
[https://www.dreamstime.com/aerial-view-river-bojana-ada-island-monte-montenegro-image104676694Ada Bojana
www.gov.me](https://www.dreamstime.com/aerial-view-river-bojana-ada-island-monte-montenegro-image104676694Ada%20Bojana%20www.gov.me)

9. PRILOZI

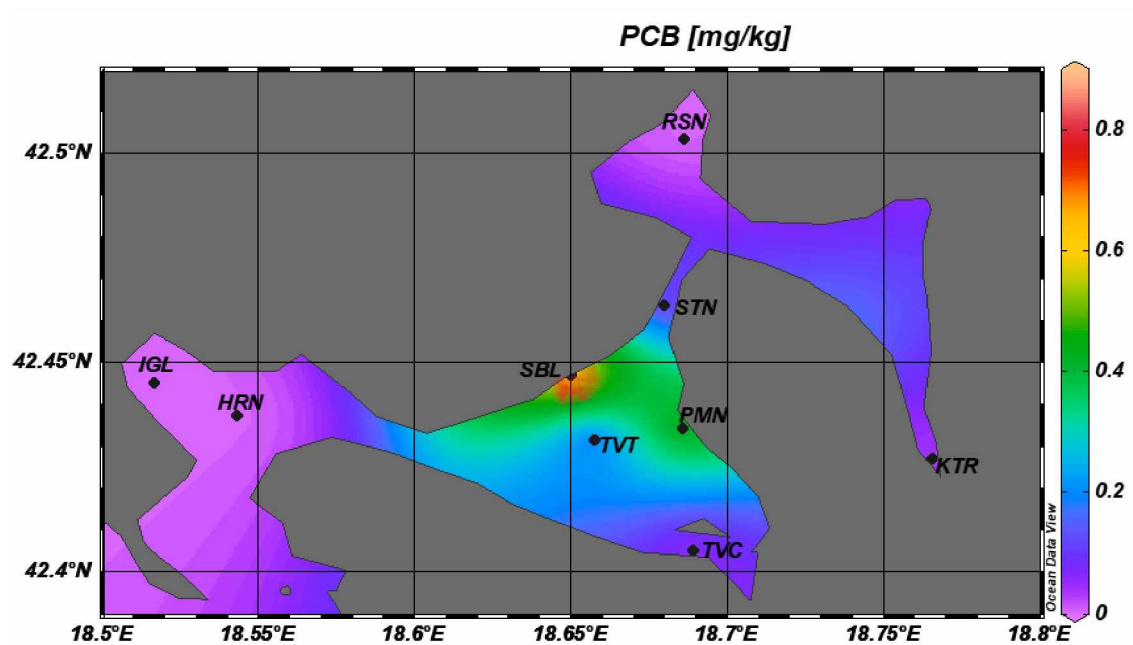
Prilog I



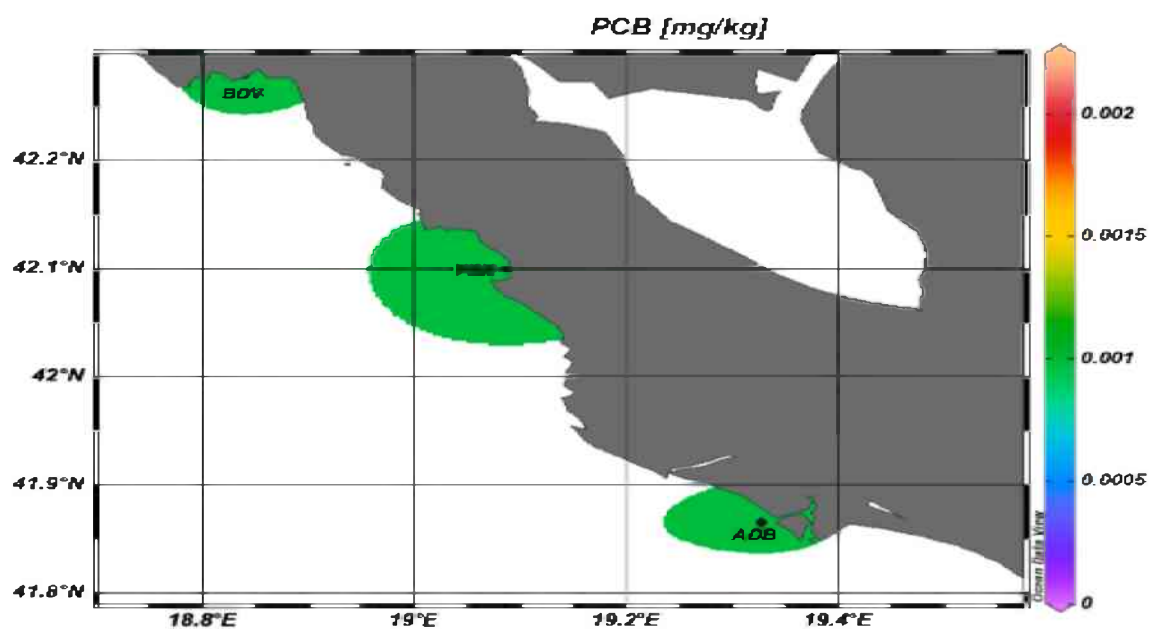
Slika I. Raspodjela PAH vrijednosti u Bokotorskom zalivu



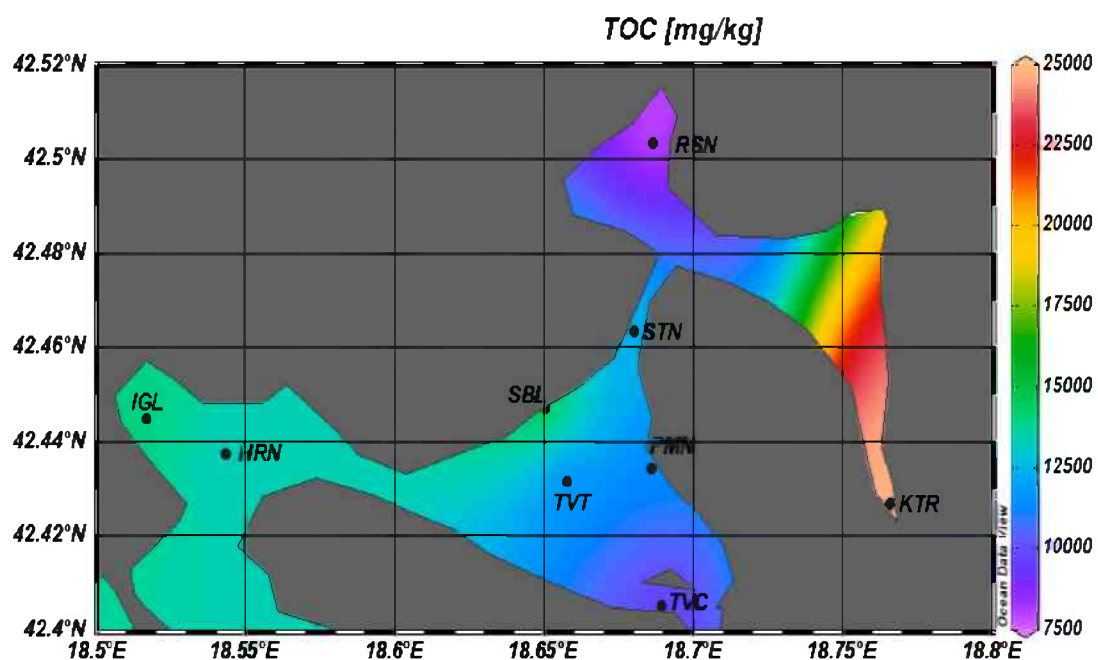
Slika II. Raspodjela PAH vrijednosti u vanzalivskom području



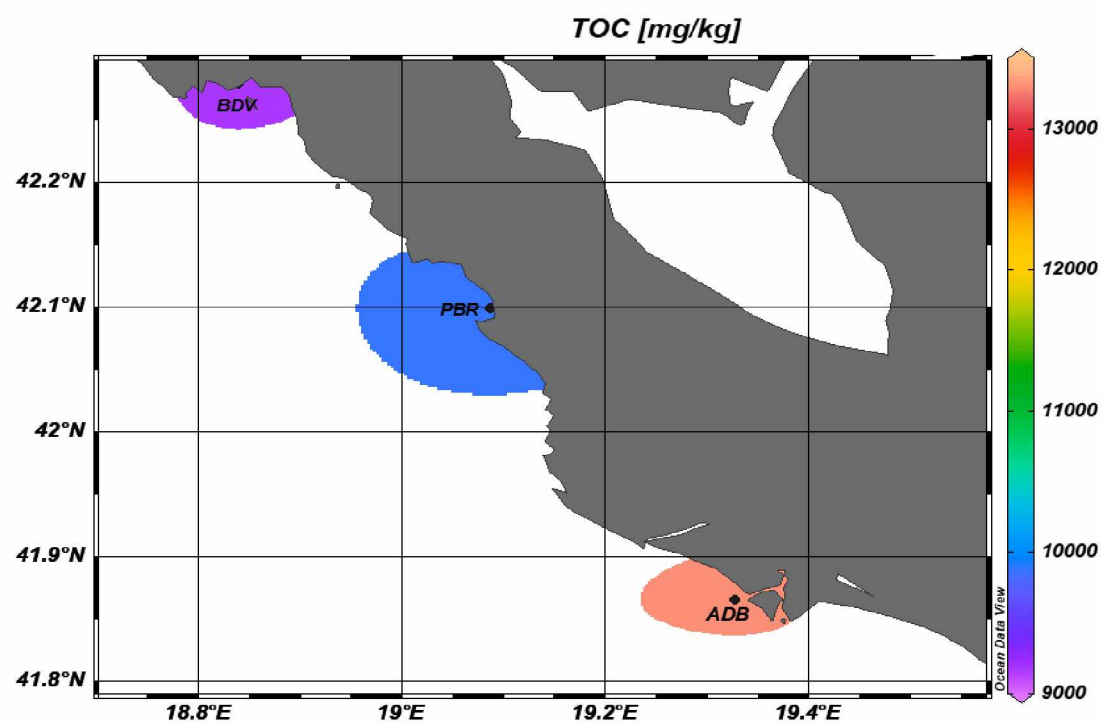
Slika III. Raspodjela ukupne PCB vrijednosti u Bokotorskom zalivu



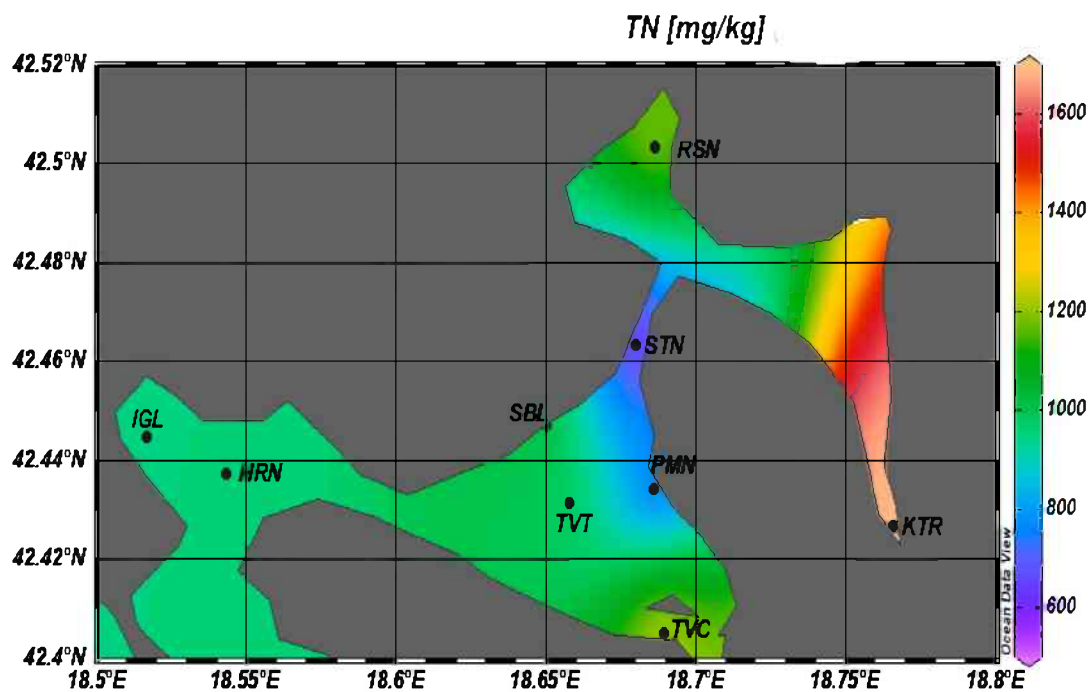
Slika IV. Raspodjela ukupne PCB vrijednosti u vanzalivskom području



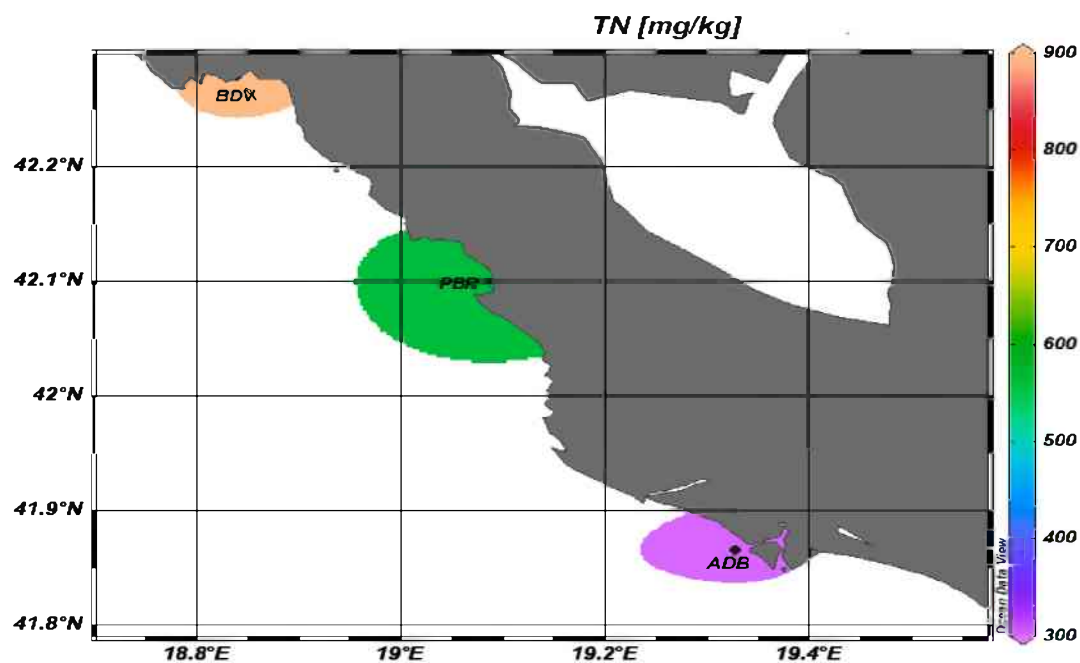
Slika V. Raspodjela TOC vrijednosti u Bokotorskom zalivu



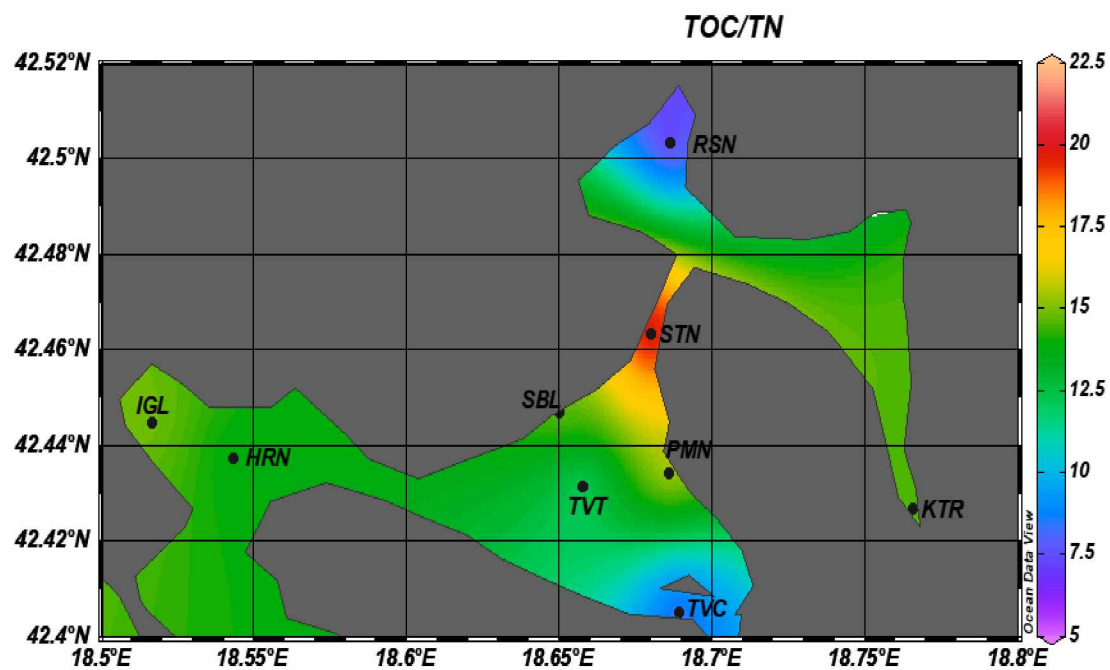
Slika VI. Raspodjela TOC vrijednosti u vanzalivskom području



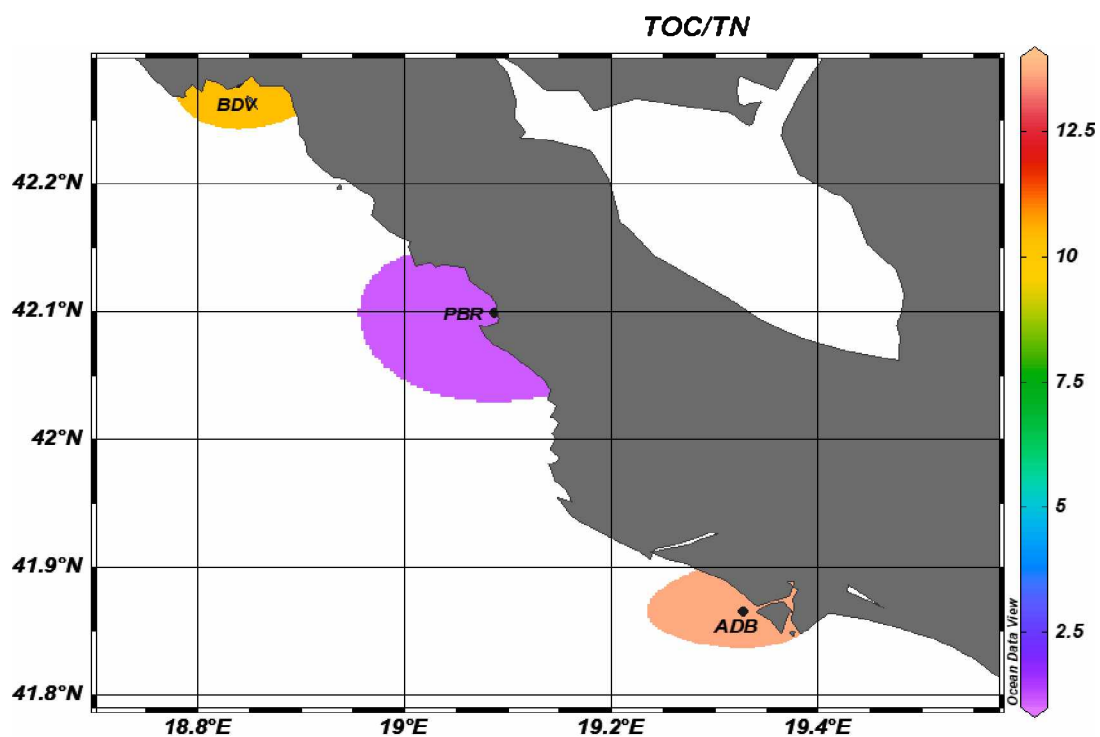
Slika VII. Raspodjela TN vrijednosti u Bokotorskom zalivu



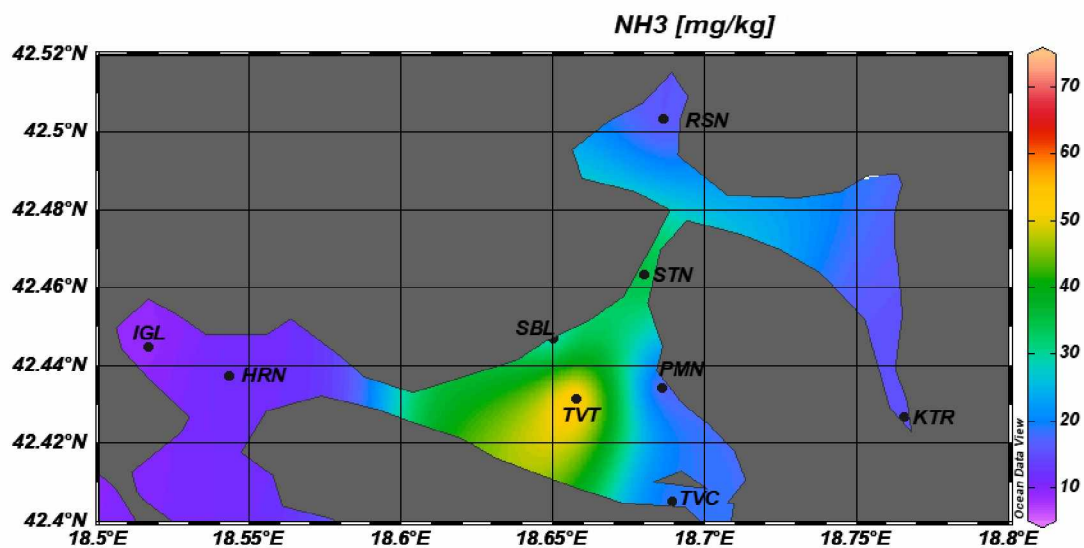
Slika VIII. Raspodjela TN vrijednosti u vanzalivskom području



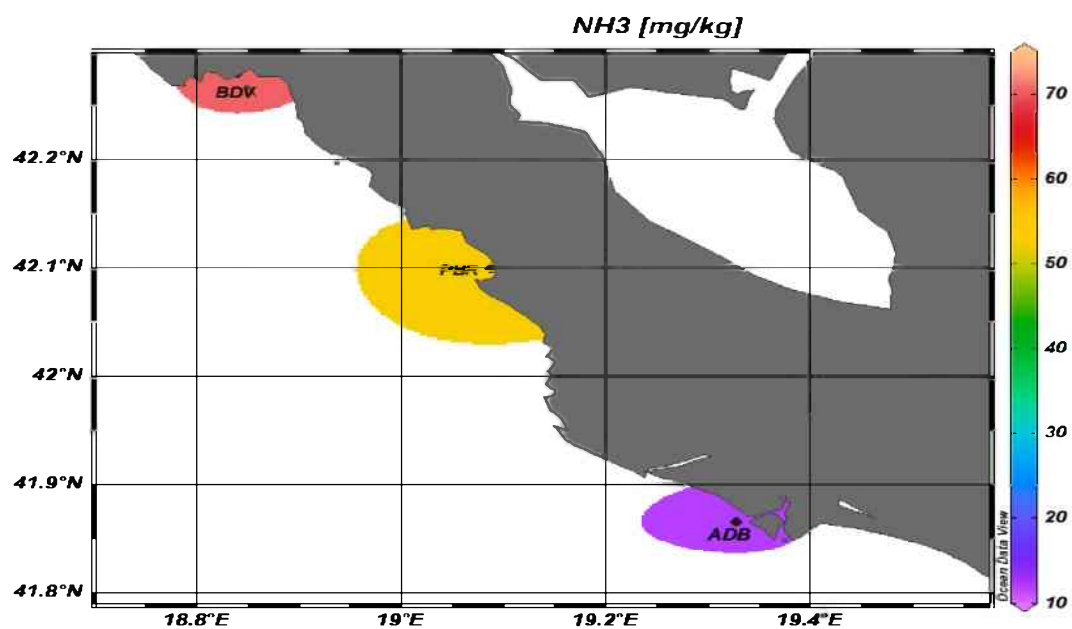
Slika IX. Raspodjela TOC/TN vrijednosti u Bokkotorskom zalivu



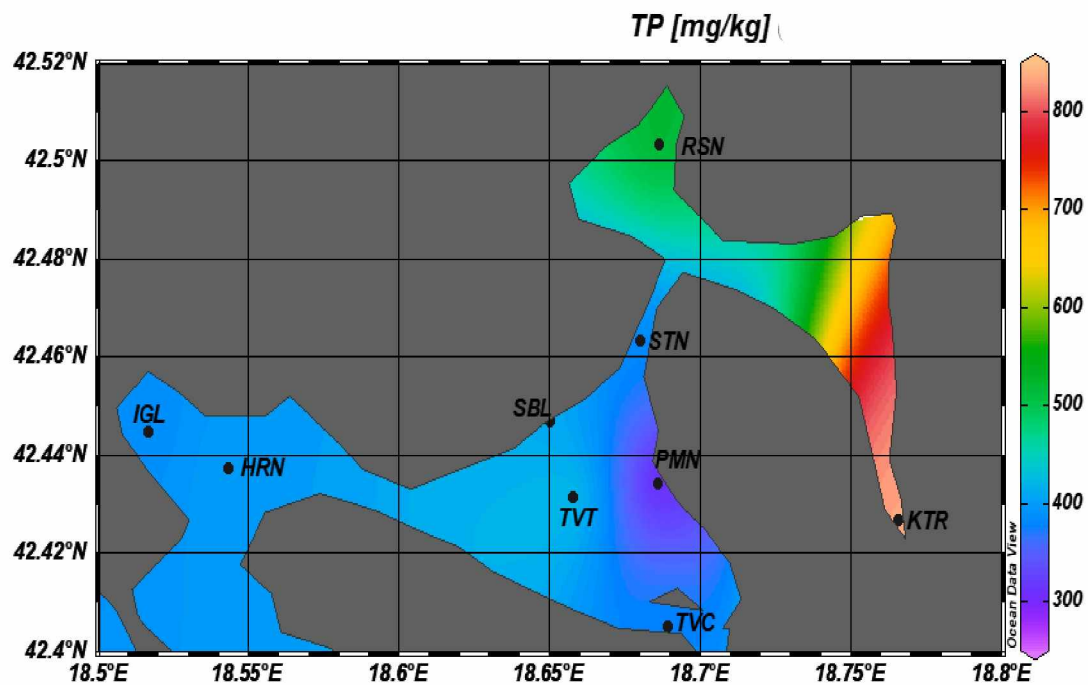
Slika X. Raspodjela TOC/TN vrijednosti u vanzalivskom području



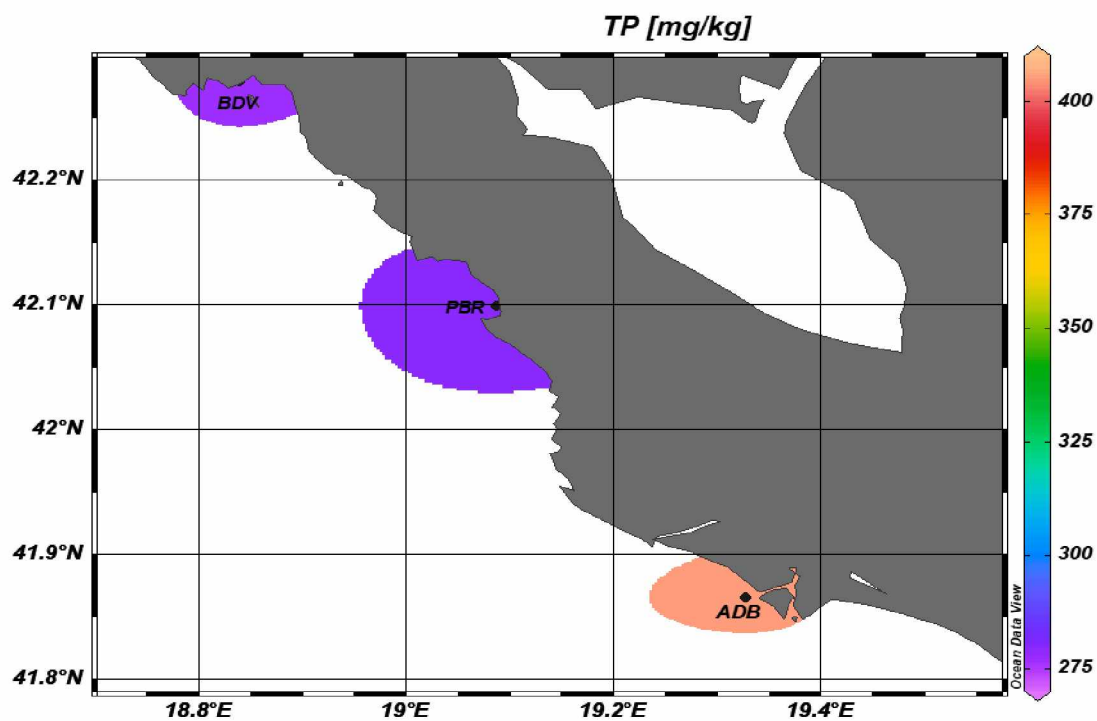
Slika XI. Raspodjela NH_3 vrijednosti u zalivskom području



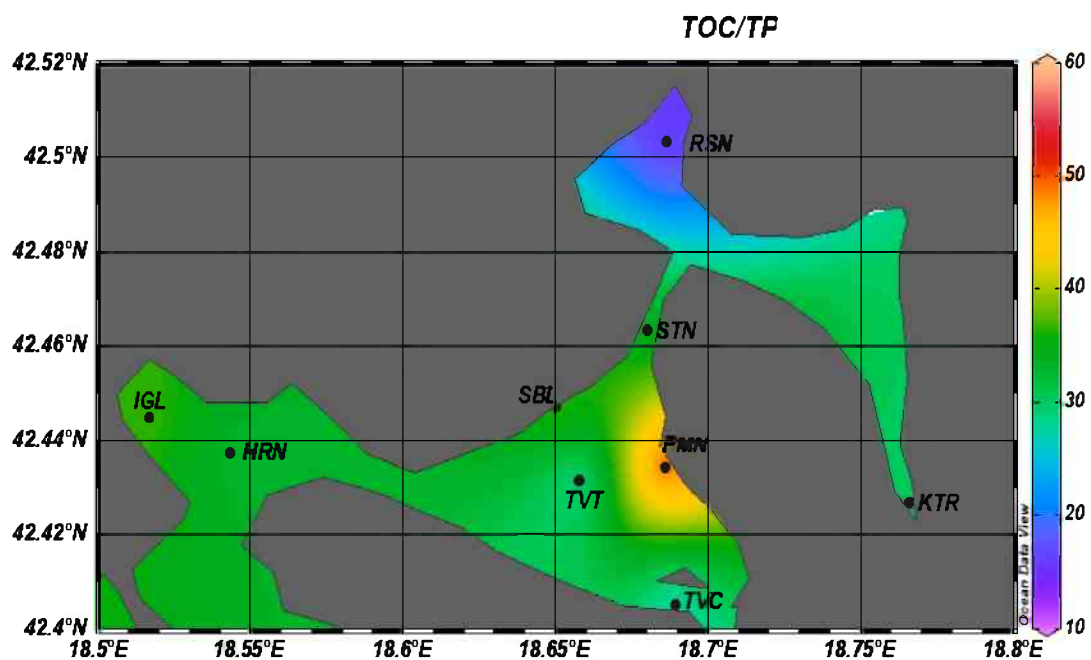
Slika XII. Raspodjela NH_3 vrijednosti u izvanzalivskom području



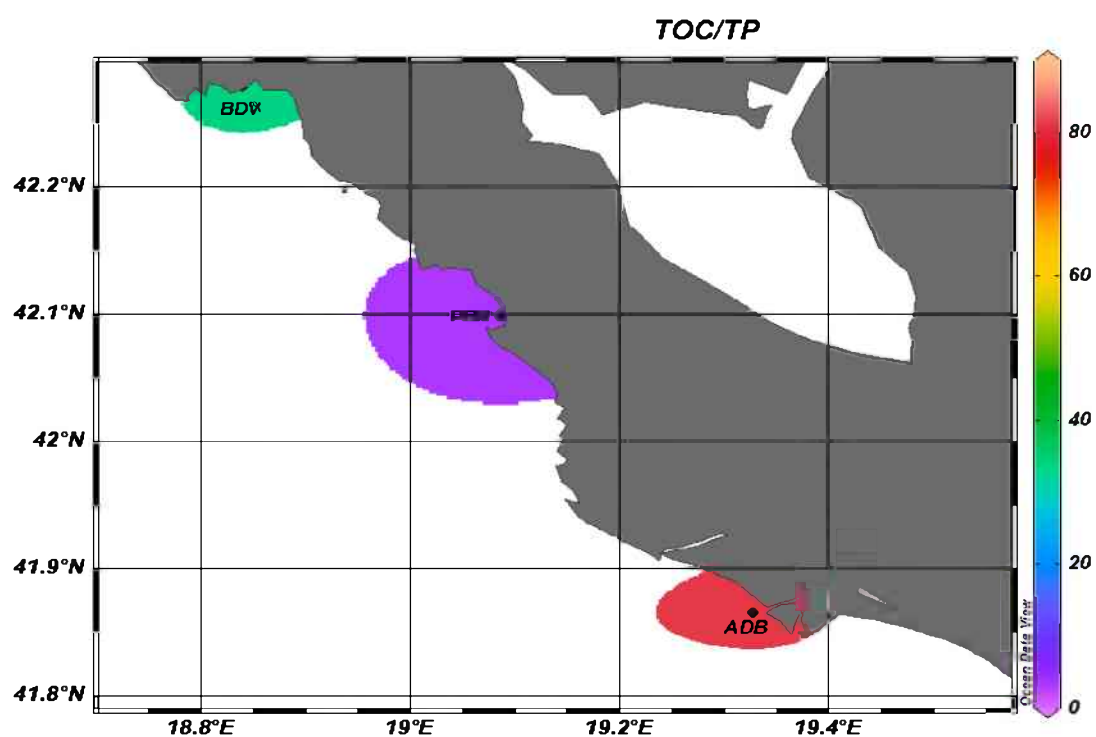
Slika XIII. Raspodjela TP vrijednosti u Bokotorskom zalivu



Slika XIV. Raspodjela TP vrijednosti u vanzalivskom području



Slika XV. Raspodjela TOC/TP vrijednosti u Bokotorskom zalivu



Slika XVI. Raspodjela TOC/TP vrijednosti u vanzalivskom području

Prilog II

Tabela I. Prikaz koncentracija PAH i PCB komponenti na ispitanim lokacijama. Boldovane brojke pokazuju komponente sa koncentracijom većom od dozvoljene (iznad ERL vrijednosti)

mg kg ⁻¹ d.w.	Lokacije												Ospar granične vrijednosti	
	KTR	RSN	STN	PMN	TVC	TVT	SBL	HRN	IGL	BDV	PBR	ADB	BAC	ERL
Naftalen (Naph)	0.114	0.009	0.033	0.097	0.018	0.022	0.594	0.020	0.004	0.005	0.010	0.004	0.008	0.160
Acenaftilen (Aceph)	0.015	0.004	0.004	0.017	0.004	0.004	0.037	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	-	-
Acenaften (Ace)	0.024	0.004	0.011	0.090	0.004	0.006	0.283	0.005	0.004	0.018	0.006	0.004	-	-
Fluoren (Fl)	0.034	0.004	0.013	0.102	0.005	0.006	0.259	0.005	0.004	0.021	0.005	0.004	-	-
Fenantren (Phen)	0.327	0.041	0.120	0.908	0.041	0.070	1.560	0.058	0.021	0.213	0.045	0.004	0.032	0.240
Antracen (Ant)	0.081	0.011	0.026	0.209	0.007	0.016	0.281	0.011	0.004	0.047	0.007	0.004	0.005	0.085
Fluoranten (Flu)	0.653	0.078	0.197	1.270	0.067	0.136	2.150	0.129	0.047	0.226	0.067	0.004	0.039	0.600
Piren (Pyr)	0.563	0.067	0.166	1.020	0.059	0.114	1.670	0.113	0.038	0.186	0.056	0.004	0.024	0.665
Benzo[a]antracen (BaA)	0.331	0.038	0.112	0.687	0.032	0.069	1.250	0.066	0.022	0.108	0.034	0.004	0.016	0.261
Krizen (Chr)	0.278	0.037	0.104	0.612	0.032	0.069	1.080	0.060	0.022	0.101	0.037	0.004	0.020	0.384
Benzo[a] piren (BaP)	0.360	0.049	0.138	0.746	0.042	0.086	1.410	0.081	0.029	0.111	0.047	0.004	0.030	0.430
Indeno[1,2,3-c,d]piren (InP)	0.238	0.034	0.093	0.494	0.035	0.070	0.994	0.063	0.023	0.057	0.037	0.004	0.103	0.240
Benzo[g,h,i]perilen(BgP)	0.243	0.036	0.106	0.464	0.034	0.089	0.898	0.061	0.024	0.061	0.039	0.004	0.080	0.085
Benzo[b]fluoranten (BbF)	0.513	0.076	0.212	1.07	0.074	0.143	2.00	0.133	0.051	0.144	0.076	0.004	-	-
Benzo[k]fluoranten (BkF)	0.192	0.034	0.078	0.385	0.028	0.059	0.73	0.050	0.020	0.055	0.029	0.004	-	-
Dibenzo[g,h,i]perilen (DBgP)	0.045	0.006	0.017	0.098	0.006	0.012	0.189	0.011	0.004	0.013	0.007	0.004	-	-
PCB 28	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.00022	0.0017
PCB 52	0.001	0.001	0.001	0.008	0.001	0.001	0.006	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.00012	0.0027
PCB 101	0.003	0.001	0.001	0.044	0.001	0.001	0.054	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.00014	0.003
PCB 118	0.003	0.0005	0.0005	0.028	0.001	0.001	0.032	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.00017	0.0006
PCB 138	0.007	0.001	0.003	0.119	0.001	0.001	0.200	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.00015	0.0079
PCB 153	0.012	0.001	0.007	0.140	0.001	0.006	0.211	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.00019	0.04
PCB 180	0.005	0.001	0.003	0.109	0.001	0.001	0.179	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.00010	0.012

Prilog III

Tabela II. Prikaz najznačajnijih korelacija (Spermanova korelacija) utvrđenih metaboličkih puteva sa ispitivanim hemijskim parametrima ($p \leq 0.05$)

Naziv (metabolički put)	PAH	PCB	TOC	TN	TP	NH3
Aerobaktin biosinteza (AEROBACTINSYN-PWY)		-0.64	0.60			
Horizmat metabolizam (superpathway of chorismite metabolism)			0.68			
Arginin biosinteza (acetil ciklus) L-arginine biosynthesis II (acetyl cycle)	0.58					
L-aspartat I L-asparagin biosinteza (superpathway of L-aspartate and L-asparagine biosynthesis)					-0.63	
L-arginin degradacija II (AST pathway)			0.69			
Calvin-Benson-Bassham ciklus (CALVIN-PWY)			-0.60		-0.60	
Piruvat fermentacija do butanoata (CENTFERM-PWY)			-0.67		-0.61	
Nitrat redukcija (denitrifikacija) DENITRIFICATION-PWY					-0.63	
Heksuronid I heksuronat degradacija (GALACT-GLUCUROCAT-PWY)				-0.59	-0.65	
Galat degradacija I GALLATE-DEGRADATION-II-PWY Galat degradacija II GALLATE-DEGRADATION-I-PWY					-0.70	
Glikoliza I (od glukoze 6 fosfata) GLYCOLYSIS			-0.71			
NAD biosinteza II (od triptofana) (NADSYN-PWY)	-0.65	-0.58				
L-glutamat degradacija V (preko hidroksiglutarata) PWY P162			-0.67			
L-lizin fermentacija do acetata i butanoate (PWY 163)				-0.66		
protokatehat degradacija I PWY 184			-0.61	-0.73		
reduktivni TCA ciklus I PWY 23		-0.69				
Koenzim b biosinteza PWY 241						-0.81
Aerobna respiracija I (citohrom c) PWY 3781		-0.71		-0.66		
β-alanin biosinteza II PWY 3941		0.69				
Kreatinin degradacija II PWY4722				-0.77	-0.60	
Katehol degradacija do 2-oksopent-4-enoata II (PWY 5419)	-0.86	-0.79				
Katehol degradacija II (PWY 5420)	-0.75	-0.74				
Meta metabolizam aromatičnih jedinjenja (PWY5430)	-0.67					
Degradacija aromatičnih supstanci preko β-ketoadipata (PWY5431)				-0.59	-0.62	
2-nitrobenzoat degradacija I (PWY 5647)	-0.90	-0.81				
L-triptofan degradacija IX	-0.89	-0.78				

(PWY 5655)						
1,4-dihidroksi-2-naftoat biosinteza I (PWY 5837)	-0.68	-0.78		-0.62		
menakinol-8 biosinteza I (PWY 5838)	-0.70	-0.78		-0.69		
menakinol-7 biosinteza (PWY 5840)		-0.61		-0.75	-0.62	
menakinol-9 biosinteza (PWY 5845)	-0.60	-0.61		-0.64		0.61
menakinol-6 biosinteza I (PWY 5850)	-0.60	-0.61		-0.64		0.61
demetilménakinol-6 biosinteza I (PWY 5860)	-0.60	-0.61		-0.64		-0.61
demeilménakinol-8 biosinteza (PWY 5861)	-0.70	-0.78		-0.69		
demetilménakinol-9 biosynthesis (PWY 5862)	-0.60	-0.61		-0.64		-0.61
Filokinol biosinteza PWY 5863	-0.68	-0.78		-0.62		
Menakinol-10 biosinteza (PWY 5896)	-0.60	-0.61		-0.64		-0.61
Menakinol-11 biosinteza (PWY 5897)	-0.70	-0.78		-0.69	-	
Menakinol 12 biosinteza PWY 5898	-0.70	-0.78		-0.69	-	
Menakinol 13-biosinteza (PWY 5899)	-0.70	-0.78		-0.69		
palmitat biosinteza II (bakterije I biljke) (PWY 5971)	-0.59	-0.68				
2-aminofenol degradacija (PWY 6210)	-0.58					
mikolil-arabinogalaktan-peptidoglikan kompleks biosinteza (PWY-6397)					-0.66	
L-triptofan degradacija XII (Geobacillus) PWY-6505	-0.62					
Metabolički put <i>Clostridium acetobutylicum</i> acidogena fermentacija			-0.67		-0.61	
tiazol biosinteza II (Bacillus) PWY-6891	0.61					
mandelat degradacija do acetil-CoA PWY-6957			0.74			
1,5-anhidrofruktoza degradacija PWY-6992				-0.61	-0.58	
vanillin i vanillate degradacija I PWY-7097				-0.69	-0.61	
vanillin and vanillate degradacija II PWY-7098						
piruvat fermentacija do izobutanola PWY-7111	0.62					
L-arabinoza degradacija IV PWY-7295	-0.63					
demetilménakinol-6 biosinteza II PWY-7373			-0.61			
1,4-dihidroksi-6-naftoat biosinteza I PWY-7374			-0.62			
aromatična biogena amin degradacija (bakterija) PWY-7431					-0.61	
L-serin i glicin biosinteza I			-0.61			
TCA ciklus I (prokarioti)			-0.61			

Prilog IV

Tabela III. Prikaz najznačajnijih korelacija (Spermanova korelacija) utvrđenih ABC transportnih proteina sa ispitivanim hemijskim parametrima ($p \leq 0.05$)

Naziv	PAH	PCB	TOC	TP	TN	NH ₃
K02000 proV; glicin betain/prolin transportni sistem ATP-vezujućeg proteina	0.79					
K02001 proW; glicin betain/prolin transportni sistem permeaza proteina	0.73					
K02002 proX; glicin betain/prolin transportni sistem substrat-vezujući protein	0.79					
K02010 afuC; gvožđe (III) transportni sistem ATP-vezujućeg proteina			0.72			
K02011 afuB; gvožđe (III) transportni sistem permeaza protein			0.60			
K02012 afuA; gvožđe (III) transportni sistem substrat-vezujući protein			0.89			
K02041 phnC; fosfonat transportni sistem ATP-vezujući protein	0.88					
K02042 phnE; fosfonat transportni sistem permeaza protein	0.89					
K02065 mlaF; fosfolipid/holesterol/gamma-HCH transportni sistem ATP-vezujući protein					0.59	
K02066 mlaE; fosfolipid/holesterol/gamma-HCH transportni sistem permeaza protein					0.60	
K02067 mlaD; fosfolipid/holesterol/gama-HCH transportni sistem substrat-vezujući protein					0.71	
K02071 metN; D-metionin transportni sistem ATP-vezujući protein					-0.60	
K02424 fliY; L-cistin transportni sistem supstrat vezujući protein					-0.72	
K05813 ugpB; sn-glicerol 3-fosfatni transportni sistem substrat vezujućeg proteina	0.67	0.75				
K05814 ugpA; sn-glicerol 3-fosfatni transportni sistem permeaza proteina	0.76	0.77				
K06726 pstB; fosfatni transportni sistem ATP-vezujućeg proteina				-0.81		
ko:K05776 modF; molibdat transportni sistem ATP-vezujućeg proteina					-0.66	
K05813 ugpB; sn-glicerol 3-fosfatni transportni sistem substrat-vezujućeg proteina	0.67	0.75				
K05814 ugpA; sn-glicerol 3-fosfatni transportni sistem permeaza proteina	0.76	0.77				
K05815 ugpE; sn-glicerol 3-fosfatni transportni sistem permeaza protein	0.79	0.78				
K05816 ugpC; sn-glicerol 3-fosfatni transportni sistem ATP-vezujući protein	0.77	0.77				
K09690 ABC-2.LPSE.P; lipopolisaharidni transportni sistem permeaza proteina			-0.63			
K09691 ABC-2.LPSE.A; lipopolisaharidni transportni sistem ATP-vezujućeg proteina			-0.68			
K09815 znuA; cink transportni sistem substrate-binding protein						0.80

K09816 znuB; cink transportni sistem permeaza proteina	0.60					0.62
K09817 znuC; cink transportni sistem ATP-vezujućeg proteina	0.61					0.67
K09969 aapJ; opšti L-amino kiselinski transportni sistem substrat-vezujućeg proteina	0.75					
K09970 aapQ; opšti L-amino kiselinski transportni sistem permeaza proteina	0.76					
K09971 aapM; opšti L-amino kiselinski transportni sistem permeaza proteina	0.76					
K09972 aapP; opšti L-amino kiselinski transportni sistem ATP-vezujućeg proteina	0.75					
K10001 gltI; glutamat/aspartat transportni sistem substrat-vezujućeg proteina				-0.80	0.83	
K10002 gltK; glutamat/aspartat transportni sistem permeaza proteina				-0.59	-0.70	
K10003 gltJ; glutamat/aspartat transportni sistem permeaza proteina				-0.59	-0.75	
K10004 gltL; glutamat/aspartate transportni sistem ATP-vezujućeg proteina				-0.59	-0.70	
K10236 thuE; trehaloza/maltoza transportni sistem substrat vezujućeg proteina					-	-0.79
K10237 thuF; trehaloza/maltoza transportni sistem permeaza proteina					-	-0.79
K10238 thuG; trehaloza/maltoza transportni sistem permeaza proteina					-	-0.79
K10548 ABC.GGU.A; Višestruki transportni sistem šećera ATP-vezujućeg proteina				-0.58	-	
K10823 oppF; oligopeptidni transportni sistem ATP-vezujućeg proteina		0.61				
K11069 potD; spermidin/putreskin transportni sistem substrat vezujućeg proteina	0.87					
K11070 potC; spermidin/putreskin transportni sistem permeaza proteina	0.89					
K11071 potB; spermidin/putreskin transportni sistem permeaza proteina	0.89					
K11072 potA; spermidine/putreskin transportni sistem ATP-vezujućeg proteina	0.90					
K11073 potF; putreskin transportni sistem substrat-vezujućeg proteina	0.79	0.66				
K11074 potI; putreskin transportni sistem permeaza proteina	0.84	0.70				
K11075 potH; putreskin transportni sistem permeaza proteina	0.84	0.70				
K11959 urtA; urea transportni sistem substrate-vezujućeg proteina		0.59				
K11960 urtB; urea transportni sistem permeaza proteina		0.61				
K11961 urtC; urea transportni sistem permeaza proteina		0.61				
K11962 urtD; urea transportni sistem ATP-vezujućeg proteina		0.61				
K15581 oppB; oligopeptidni transportni sistem permeaza proteina				-0.62	-0.76	
K15582 oppC; oligopeptidni transportni sistem permeaza proteina				-0.62	-0.76	
K15583 oppD; oligopeptidni transportni					0.66	

sistem ATP-vezujućeg proteina						
K15770 cysB; arabinogalaktan oligomer / maltooligosaharid transportni sistem substrat vezujućeg proteina	-0.61	-0.58				
K15771 ganP; arabinogalaktan oligomer / maltooligosaharid transportni sistem permeaza proteina	-0.61					
K15772 ganQ; arabinogalaktan oligomer / maltooligosaharid transportni sistem permeaza proteina	-0.60					
K16783 bioN; biotin transportni sistem permeaza proteina	0.68					
K16784 bioM; biotin transportni sistem ATP-vezujući protein	0.65					
K16784 bioM; biotin transportni sistem ATP-vezujući protein	0.65					
K17321 glpV; glicerol transportni sistem substrat-vezujući protein	0.63	0.73				
K17322 glpP; glicerol transportni sistem permeaza proteina	0.63	0.73				
K17323 glpQ; glicerol transportni sistem permeaza proteina	0.63	0.73				
K17324 glpS; glicerol transportni sistem ATP-vezujućeg proteina	0.63	0.73				
K17325 glpT; glicerol transportni sistem ATP-vezujućeg proteina	0.63	0.73				
K19340 nosF; bakar-procesni sistem ATP-vezujućeg proteina				-0.62	-0.62	-0.58
K19341 nosY; bakar-procesni sistem permeaza proteina					-0.63	-0.61

BIOGRAFIJA



Jokanović Sandra je rođena 02.11.1982 u Kotoru. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Kotoru. Diplomirala je na Prirodno-matematičkom fakultetu, studijski program Biologija u Podgorici 2007 godine, a specijalističke studije na istom fakultetu završila 2010 godine. Magistarsku tezu pod nazivom "Procjena brojnosti mikrobioloških zajednica u Bokokotorskom zalivu CARD FISH metodom i epifluorescentnom mikroskopijom" odbranila je u julu 2014.godine, takođe na Prirodno-matematičkom fakultetu, smjer Ekologija. Doktorske studije upisala je 2014/2015 godine na Prirodno-matematičkom fakultetu u Podgorici, studijski program biologija.

U Institutu za biologiju mora odradila je pripravnički staž 2009-2010 godine. Od 2010 do 2014 godine angažovana je kao saradnik na projektima Instituta u Laboratoriji za hemiju, biohemiju i molekularnu biologiju. Od 2015 zaposlena je kao saradnik u istraživanju u Institutu za biologiju mora, prvo u Laboratoriji za opštu biologiju i zaštitu mora a od 2017.godine u Laboratoriji za plankton i kvalitet morske vode. Oblast istraživanja kojim se bavi je ekološka mikrobiologija sa posebnim osvrtom na sediment, sanitarna mikrobiologija, zaštita mora. Rukovodilac je akreditovanih metoda na Odjelenju za ispitivanje vode. Izlagala je radove na međunarodnim konferencijama i simpozijumima. Autor je i koautor u više naučnih radova i monografija iz oblasti ekološke mikrobiologije. Pohađala je značajne obuke i kurseve od kojih se izdvajaju "Training programme on regional ocean governance for Mediterranean and Eastern European Countries" organizovan od strane IOI (International Ocean Institut), Univerzitet na Malti, "Training on analytical techniques for the determination of trace elements in marine samples" organizovan od strane Međunarodne Agencije za Atomsku Energiju (IAEA) u Monaku; kao i "Molecular biology summer school on single cell dissociation and analysis" organizovanog od strane Ministarstva nauke Crne Gore i Evropske Laboratorije za molekularnu biologiju (EMBL). Član je udruženja mikrobiologa Crne Gore.

IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani/a Sandra Jokanović

Broj indeksa/upisa 2/2014

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Filogenetska analiza bakterijskih zajednice u sedimentima Crnogorskog primorja i procjena uticaja polutanata na njihovu distribuciju i strukturu

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja,
- da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedio/la autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

Potpis doktoranda



U Podgorici, 15.02.2021

**IZJAVA O ISTOVJETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE DOKTORSKOG
RADA**

Ime i prezime autora: Sandra Jokanović

Broj indeksa/upisa: 2/14

Studijski program: Biologija

Naslov rada: Filogenetska analiza bakterijskih zajednice u sedimentima Crnogorskog primorja
i procjena uticaja polutanata na njihovu distribuciju i strukturu

Mentor: prof. dr. Svetlana Perović

Potpisani/a: Sandra Jokanović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju
predao/la za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem
akademskog naziva doktora nauka, odnosno zvanja doktora umjetnosti, kao što su ime i prezime, godina
i mjesto rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

U Podgorici, 15.02.2021

Potpis doktoranda

S. Jokanović

IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Filogenetska analiza bakterijskih zajednica u sedimentima Crnogorskog primorja i procjena uticaja polutanata na njihovu distribuciju i strukturu

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
- ☒ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

S. Jovanović

U Podgorici, 15.02.2021

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslabodnija od svih licenci.
2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu djela.
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, bez promjena, preoblikovanja ili upotrebe djela u svom djelu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu djela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja djela.
4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu djela i prerade.
5. Autorstvo - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, bez promjena, preoblikovanja ili upotrebe djela u svom djelu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela.
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela i preradu. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda