Struktura i raznolikost mikrobnih zajednica sesilnih stigobionata dinarskog krša

Vuk Surjan, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:157188

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-23**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Vuk Surjan

Struktura i raznolikost mikrobnih zajednica sesilnih stigobionata dinarskog krša

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Marija Vuk Surjan

Structure and diversity of sessile stygobionts microbial communities in the Dinaric karst

Master thesis

Zagreb, 2022

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Bielen i doc. dr. sc. Sandre Hudine. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Struktura i raznolikost mikrobnih zajednica sesilnih stigobionata dinarskog krša

Marija Vuk Surjan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Podzemlje dinarskog krša stanište je mnogih endemičnih i reliktnih svojti te predstavlja vruću točku bioraznolikosti na globalnoj razini. Međutim, mikrobne zajednice dinarskog krškog podzemlja slabo su istražene. U ovom radu su po prvi put opisane mikrobne zajednice endemskih sesilnih filtratora: sve tri vrste dinarskog špiljskog školjkaša (*Congeria jalzici*, *C. kusceri* i *C. mulaomerovici*) i dinarskog špiljskog cjevaša (*Marifugia cavatica*). Uzorkovana su tkiva školjkaša, obraštaj njihove ljušture, tkiva cjevaša i voda s četiri lokacije u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini. Bakterijski taksoni prisutni u uzorcima detektirani su sekvenciranjem fragmenata *16S* rRNA gena Illumina MiSeq metodom te bioinformatičkim analizama QIIME2 platformom. Ukupno je detektirano 43 bakterijska koljena s koljenom Proteobacteria kao najzastupljenijim i 373 porodice. Nadalje, utvrđene su značajne razlike u sastavu i abundanciji mikrobnih zajednica različitih tipova uzoraka: tkiva i obrisaka školjkaša, tkiva cjevaša i vode. Mikrobne zajednice tkiva cjevaša značajno su se razlikovale ovisno o lokaciji uzrokovanja, a mikrobne zajednice tkiva školjkaša nisu se značajno razlikovale ni ovisno o vrsti ni ovisno o lokaciji uzorkovanja. Zaključno, ovaj rad donosi prve podatke o mikrobnim zajednicama sesilnih filtratora dinarskog krškog podzemlja i kao takav predstavlja temelj za daljnja istraživanja hranidbenih mreža te odnosa mikrobnih zajednica i njihovih domaćina u dinarskom krškom podzemlju.

Ključne riječi: *Congeria*, *Marifugia cavatica*, endemi, mikrobiom, špiljska mikrobiologija
(34+II stranice, 16 slika, 1 tablica, 57 literaturna navoda, 2 priloga, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Voditelj rada 1: izv. prof. dr. sc. Ana Bielen
Voditelj rada 2: doc. dr. sc. Sandra Hudina

Ocjenitelji:
doc. dr. sc. Sandra Hudina
izv. prof. dr. sc. Sunčica Bosak
doc. dr. sc. Kristina Pikelj
doc. dr. sc. Luka Valožić

Rad prihvaćen: 2.6.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Structure and diversity of sessile stygobionts microbial communities in the Dinaric karst

Marija Vuk Surjan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The Dinaric karst underground is a global biodiversity hotspot inhabited by many endemic and relict taxa. However, microbial communities of Dinaric karst underground are significantly understudied. This thesis for the first time describes the microbial communities of all three Dinaric cave mussel species (*Congeria jalzici*, *C. kusceri* and *C. mulaomerovici*) and Dinaric cave tubeworm (*Marifugia cavatica*). Tissues of mussels and tubeworms, biofilm of mussel shells, and water were sampled at four locations in Croatia and Bosnia and Herzegovina. Bacterial taxa were identified by *16S* rRNA gene sequencing and QIIME2 bioinformatic analyses. A total of 43 bacterial phyla, with Proteobacteria as the most prevalent, and 373 families were detected. Significant differences in the composition of microbial communities between different sample types were found, i.e., tissue of mussels and tubeworms, biofilm of mussel shells, and water. Tubeworms' microbial communities differed significantly depending on the location, while the microbial communities of mussels were not significantly different depending on the species or the location. In conclusion, this thesis presents the first data on the microbial communities of sessile filtrators in the Dinaric karst underground and is therefore a basis for further research of food webs and host-microbe interactions in the Dinaric karst underground.

Keywords: *Congeria*, *Marifugia cavatica*, endems, microbiome, cave microbiology
(34+II pages, 16 figures, 1 table, 57 references, 2 appendices, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.
Supervisor 1: Assoc. prof. Ana Bielen, PhD
Supervisor 2: Asst. prof. Sandra Hudina, PhD

Reviewers:
Asst. prof. Sandra Hudina, PhD
Assoc. prof. Sunčica Bosak, PhD
Asst. prof. Kristina Pikelj, PhD
Asst. prof. Luka Valožić, PhD

Thesis accepted: 2.6.2022.

Sadržaj

1 Uvod ... 1
1.1 Dinarski krš i njegovo podzemlje ... 1
1.2 Ugroženost i zaštita ... 2
1.3 Sesilni stigobionti ... 2
1.3.1 Dinarski špiljski školjkaš ... 3
1.3.2 Dinarski špiljski cjevaš ... 4
1.4 Mikrobne zajednice podzemlja ... 5
2 Cilj istraživanja ... 7
3 Materijal i metode ... 8
3.1 Područje istraživanja ... 8
3.2 Uzorkovanje ... 8
3.3 Izolacija DNA ... 11
3.4 Elektroforeza DNA u agaroznom gelu ... 11
3.5 Sekvenciranje, bioinformatička i statistička obrada ... 12
3.5.1 Pretprocesiranje ... 12
3.5.2 Pročišćavanje sekvenci od grešaka i šumova ... 12
3.5.3 Filtriranje nebakterijskih taksona i taksonomska raznolikost ... 13
3.5.4 Priprema za statističku obradu ... 13
3.5.5 Alfa raznolikost ... 14
3.5.6 Beta raznolikost ... 14
4 Rezultati ... 15
4.1 Taksonomska i alfa raznolikost ... 15
4.2 Beta raznolikost ... 21
5 Rasprava ... 24
6 Zaključak ... 27
7 Literatura ... 28
8 Životopis ... 34
9 Prilozi ... I

1 Uvod

1.1 Dinarski krš i njegovo podzemlje

Dinarski krš jedinstveno je područje koje se prostire duž Slovenije, zapadne i južne Hrvatske, zapadne Bosne i Hercegovine, Crne Gore i sjevera Albanije. Obuhvaća najveći krški prostor u Europi i površine je oko 60 000 km^2 (Mihevc i sur., 2010). Čak 46 % površine Hrvatske čini upravo krški reljef (Gottstein, 2010) od čega velik dio pripada dinarskom kršu.

Općenito, krš je jedinstveni tip reljefa kojeg primarno gradi biogena sedimentna stijena vapnenac čija su najznačajnija obilježja poroznost i topivost. Velika poroznost se odnosi na visok postotak šupljina u ukupnom volumenu stijene što onda uz djelovanje vode stvara idealne uvjete za proširivanje postojećih šupljina i pukotina. Zahvaljujući tome, krška područja su često prožeta interesantnim podzemnim oblicima, odnosno speleološkim objektima (Ford i Williams, 2007).

Speleološki objekti specifična su staništa s pretežito stabilnim ekološkim uvjetima. To uključuje potpuni nedostatak svjetla, relativno stalnu temperaturu zraka i vrlo visoku relativnu vlažnost zraka. Tako stabilni abiotički čimbenici čine podzemna staništa i njihovu faunu među najranjivijima na svijetu (Wilkens i sur., 2001). Nadalje, kako podzemna staništa nemaju fotosintetskih organizama, a fotosinteza je dominantan tip primarne proizvodnje u površinskim ekosustavima, ona pretežno trofički ovise o hranjivim tvarima koje stižu vodom s površine, većinom su oligotrofna i zbog toga se mogu smatrati ekstremnim staništima.

Organizmi u podzemlju razvili su niz prilagodbi na specifične uvjete u kojima žive, dijele se na potpuno prilagođene koje provode čitav život u tami i djelomično prilagođene koje žive unutar i van speleoloških objekata. Potpuno prilagođene stanovnike podzemlja nazivamo troglobiontima ako žive na kopnu te stigobiontima ako žive u vodi, dok su djelomično prilagođeni troglofili odnosno stigofili. Uz njih se još mogu naći slučajni stanovnici podzemlja koji nisu prilagođeni podzemnim uvjetima – troglokseni i stigokseni (Gottstein Matočec i sur., 2002).

Zahvaljujući specifičnom biogeografskom položaju, područje dinarskoga krša poslužilo je kao refugij velikom broju vrsta tijekom ledenih doba pa su tako te vrste uspješno preživjele razne klimatske i geomorfološke promjene kroz povijest (Moldovan i sur., 2018). Upravo je to glavni razlog izuzetno velikom broju endemskih i reliktnih vrsta te je zbog toga dinarski krš na svjetskoj razini prepoznat kao vruća točka (engl. *hot spot*) bioraznolikosti (Andersen i sur.,

2016; Bilandžija i sur., 2013; Culver i Sket, 2000; Gaston i David, 1994; Ozimec i sur., 2009; Sket, 1999; Vörös i sur., 2017). U Hrvatskoj je utvrđeno preko 500 vrsti troglobionata i stigobionata među kojima dominiraju redom kukci, paučnjaci, rakovi, puževi i stonoge. Većina vrsta su endemske za Dinaride, a čak 80 % vrsta su endemi Hrvatske (Ozimec i sur., 2009).

1.2 Ugroženost i zaštita

Razni negativni antropogeni utjecaji predstavljaju glavnu prijetnju dinarskom kršu i njegovom živom svijetu. Krški reljefni oblici uništavaju se prvenstveno fizičkom devastacijom staništa odnosno izgradnjom prometnica, kamenoloma i tunela. Dodatni problem predstavlja onečišćenje otpadnim vodama, raznim kemikalijama i teškim metalima kao i sveprisutno neadekvatno odlaganje otpada (Bilandžija i sur., 2014; Ozimec i sur., 2009). Osim što su ovom vrstom onečišćenja izravno ugroženi vodeni špiljski organizmi, ugrožene su i zalihe pitke vode jer su upravo krški vodonosnici među najvažnijim prirodnim resursima Hrvatske (Biondić i Biondić, 2014). Neophodno je provoditi sustavna istraživanja i kontinuirano praćenje uvjeta kako bi se promjene stanja u podzemlju mogle što ranije uočiti.

Prema Crvenoj knjizi špiljske faune Hrvatske i prema kriterijima ugroženosti Međunarodne organizacije za zaštitu prirode (engl. *International Union for Conservation of Nature* – IUCN) ugroženo je čak 186 špiljskih svojti, dok je Zakonom o zaštiti prirode (NN 80/13 i 15/18) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (NN 144/13 i 73/16) u Hrvatskoj zaštićena sva špiljska fauna. Osim toga, određena područja Hrvatske su ulaskom Hrvatske u Europsku uniju 2013. godine postala dio ekološke mreže Natura 2000. Ta područja predstavljaju prirodna staništa od interesa za Europsku uniju, važna su za očuvanje ugroženih vrsta i tipova staništa te su među njima prepoznata i podzemna staništa. Tipu *Špilje i jame zatvorene za javnost* pripada preko 400 podzemnih staništa. Osim samih staništa, postoji i popis ciljnih vrsta Natura 2000 te se na njemu nalaze tri prava stanovnika podzemlja: troglobiont tankovratić (*Leptodirus hochenwartii* Schmidt, 1832) te stigobionti čovječja ribica (*Proteus anguinus* Lorenti, 1768) i južni dinarski špiljski školjkaš (*Congeria kusceri* Bole, 1962) (NN 124/13 i 105/15) koji je jedan od uzorkovanih organizama u ovom radu.

1.3 Sesilni stigobionti

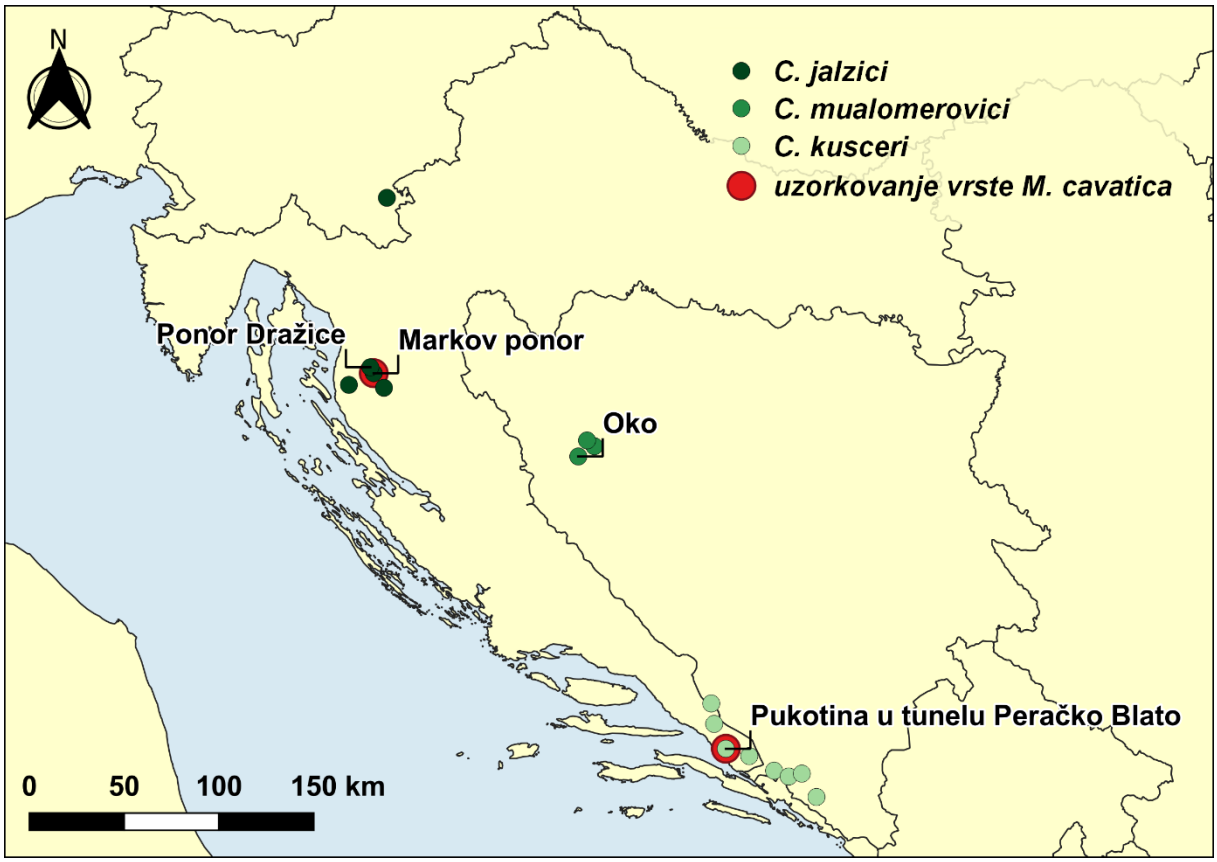
Fokus ovog diplomskog rada su sesilni stigobionti koji, osim što žive u vrlo oligotrofnom staništu, nemaju mogućnosti kretanja za hranom već su pričvršćeni za stijene i hrane se filtriranjem hranjivih tvari iz procjednih voda. U odgovarajućim uvjetima, ove populacije grade velike kolonije. Postoje tri skupine sesilnih stigobionata u dinarskom kršu: spužve, cjevaši i

školjkaši. Spužve i cjevaši imaju po jednog predstavnika, ogulinsku špiljsku spužvicu (*Eunapius subterraneus* Sket i Velikonja, 1984) i dinarskog špiljskog cjevaša (*Marifugia cavatica* Absolon i Hrabe, 1930), dok su danas poznate tri vrste špiljskih školjkaša: sjeverni dinarski špiljski školjkaš (*Congeria jalzici* Morton i Bilandžija, 2013), bosanski dinarski špiljski školjkaš (*Congeria mulaomerovici* Morton i Bilandžija, 2013) i južni dinarski špiljski školjkaš (*Congeria kusceri*) (**slika 1**). Ogulinska špiljska spužvica jedina je poznata stigobiontska spužva na svijetu te je endem Ogulinsko-plaščanske zavale i okolice (Bilandžija i sur., 2007). U ovom su radu uzorkovane sve vrste dinarskog špiljskog školjkaša i dinarski špiljski cjevaš.

1.3.1 Dinarski špiljski školjkaš

Rod *Congeria* rasprostranjen je na području dinarskoga krša u Sloveniji, Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini (**slika 2**). Cijeli se rod smatrao izumrlim, sve dok 1934. godine nisu pronađene ljušture školjkaša na temelju kojih je pretpostavljeno da žive u podzemlju. Prvi živi primjerci su nađeni kasnije te je tek 1962. godine opisana vrsta *C. kusceri*, a 2013. godine preostale dvije vrste *C. jalzici* i *C. mulaomerovici* (Bilandžija i sur., 2013). Ove vrste ostatak su faune koja je živjela u tercijaru pa ih se zato naziva tercijarnim reliktima. Žive u skupinama pričvršćene bisusnim nitima na stijene podzemnih kanala i hrane se organskim česticama filtriranjem vode (Jovanović Glavaš i sur., 2017).

Slika 1. Južni dinarski špiljski školjaš (*Congeria kusceri*) (foto: H. Bilandžija).



Slika 2. Karta s istaknutim lokalitetima na kojima su zabilježene živuće populacije roda *Congeria*. Lokaliteti s istaknutim imenima su oni na kojima su provedena uzorkovanja te su crvenom bojom naglašeni oni gdje je uzorkovana i vrsta *Marifugia cavatica*.

1.3.2 Dinarski špiljski cjevaš

Dinarski špiljski cjevaš (*M. cavatica*) (**slika 3**) endem je dinarskog krša od sjeveroistoka Italije pa do sjeverne Albanije (Kupriyanova i sur., 2009). Na **slici 2** prikazane su lokacije na kojima je uzorkovan u sklopu ovoga rada. Jedini je poznati predstavnik porodice cjevaša (Serpulidae) koji živi u podzemlju. Na mjestima mirnijeg toka izgrađuje guste kolonije koje čine posebno stanište marifugijskih naslaga gdje mogu živjeti i brojni drugi organizmi. Oko svojeg crvolikog tijela izgrađuje vapnenačke cjevčice dužine do 6 cm. Hrani se filtriranjem organskih čestica iz vode tako da iz cjevčice pusti perjaste lovke koje u nepovoljnim uvjetima drži zatvorenima (Gottstein Matočec i sur., 2002).

Slika 3. Dinarski špiljski cjevaš (*Marifugia cavatica*) (foto: J. Bedek).

1.4 Mikrobne zajednice podzemlja

Najveći dio istraživanja podzemlja dinarskog krša fokusiran je na njegov geološki aspekt, a postojeća biološka istraživanja odnose se pretežito na podzemne beskralježnjake (Andersen i sur., 2016; Biondić i Biondić, 2014; Jovanović Glavaš i sur., 2017). U usporedbi s time, mikrobne zajednice su slabo istražene iako mikrobi čine osnovu hranidbenih mreža u podzemlju (Moldovan i sur., 2018). Mikrobi se nalaze u svim dijelovima podzemlja, u vodi, na površini stijena i u sedimentu (ispod i iznad površine vode) te na površini i u unutrašnjosti višestaničnih organizama.

U postojećim istraživanjima mikrobnih zajednica podzemlja dinarskog krša korišteni su različiti metodološki pristupi. Dio publikacija temelji se na uzgoju bakterijskih izolata na hranjivim podlogama i njihovoj identifikaciji sekvenciranjem gena za *16S* rRNA (Pašić i sur., 2009; Velikonja i sur., 2014; Vuk, 2017) ili MALDI-TOF (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight*) masenom spektrometrijom (Mulec i sur., 2015; Vuk, 2017). Prednost ovog pristupa je mogućnost detaljne laboratorijske karakterizacije sakupljenih sojeva, premda većina mikroba iz okoliša (oko 99 %) ne može se uzgojiti u laboratoriju (Kellenberger, 2001). Stoga se u novijim istraživanjima, uključujući i ovaj rad, većinom koristi NGS (engl. *next generation sequencing*) pristup (Addesso i sur., 2021; Kostanjšek i sur., 2019). Kako bi se identificirale bakterije u određenom staništu, iz uzorka se prvo izolira ukupna DNA pa se ona

koristi kao kalup za istovremeno umnažanje fragmenata gena za *16S* rRNA svih bakterija u uzorku. Dobiveni amplikoni se sekvenciraju i rezultati obrađuju bioinformatičkim metodama. Na ovaj način dobije se informacija o (gotovo) svim bakterijama prisutnim u nekom staništu (Kraková i sur., 2016).

Većina postojećih istraživanja mikrobnih zajednica podzemlja dinarskog krša bavi se biofilmom s površine stijena speleoloških objekata (Mulec i sur., 2015; Pašić i sur., 2009; Velikonja i sur., 2014). To su okom vidljive kolonije različitih boja i oblika koje obitavaju na kombinaciji vapnenca i sedimenta. Čine ih pretežito heterotrofni mikrobi koji se hrane detritusom te predstavljaju važan izvor hrane za podzemne životinje (Gerič i sur., 2004; Mulec, 2008). Pašić i suradnici (2009) opisali su raznolikost mikrobnih zajednica vidljivih kolonija različitih oblika i boja u Pajsarjevoj jami u Sloveniji. Izolirali su ukupnu DNA, lančanom reakcijom polimerazom umnožili gen koji kodira za *16S* rRNA, klonirali dobiveni produkt i sekvencirali banku klonova. Ovim pristupom uvrdili su da na ovom staništu dominiraju bakterijska koljena Proteobacteria (razred Gammaproteobacteria), Actinobacteria i Nitrospirae te da postoji velik broj još neidentificiranih mikroorganizama koji se ne mogu uzgojiti u laboratorijskim uvjetima. Istraživanje uzgojivih izolata s istog lokaliteta (Velikonja i sur., 2014) pokazalo je dominaciju rodova *Streptomyces*, *Micrococcus* i *Rhodococcus*, a sakupljeni izolati su se djelomično preklapali s podacima iz sekvencirane banke klonova. Osim toga, dobar dio izolata imao je visoku srodnost s izolatima iz drugih podzemnih staništa te je moguće da se radi o isključivim stanovnicima podzemlja. Slično istraživanje proveli su i Mulec i suradnici (2015). Oni su MALDI-TOF masenom spektrometrijom identificirali uzgojive izolate sakupljene s površine stijena u tri objekta na području Slovenije. Izolati koje su istražili pripadaju rodu *Pseudomonas* iz koljena Proteobacteria i oni izlučuju fluorescentne pigmente zbog kojih pod speleološkom bijelom LED rasvjetom djeluju zlatno.

Osim na površini stijena, nekoliko postojećih istraživanja fokusirano je na karakterizaciju mikrobnih zajednica vode i to NGS pristupom. Pokazano je da je u uzorcima podzemne vode dinarskog krša na području Slovenije bilo prisutno 96 različitih bakterijskih porodica većinom iz koljena Proteobacteria od kojih ni jedna nije bila znatno zastupljenija od ostalih (Kostanjšek i sur., 2019). Osim toga, istraženi su i mikrobni agregati na dnu vodenih tokova špilje Vjetrenica u BiH te je utvrđeno da se sastoje od jezgre i površinskog biofilma. Jezgra se sastojala od bakterijske vrste nove za znanost nazvane Candidatus *Troglogloea absolon* koja pripada koljenu Nitrospirae, a biofilm se pretežito sastojao od pripadnika razreda Betaproteobacteria (Kostanjšek i sur., 2013).

Među različitim mikrobnim zajednicama u podzemlju posebno su zanimljive i neistražene epibiotske mikrobne zajednice na špiljskim životinjama koje mogu biti korisne za domaćina osiguravajući mu dodatni izvor hrane (Barton, 2006). Primjerice, u karbonatnim špiljama Frasassi u Italiji opisan je simbiontski odnos između kemolitotrofne epibiotske bakterije iz roda *Thiothrix* i endemskog makrobeskralježnjaka *Niphargus ictus* G. Karaman, 1985 (Dattagupta i sur., 2009). Nadalje, sekvenciranjem varijabilnih regija *16S* rRNA gena istražen je mikrobiom kože čovječje ribice *Proteus anguinus* na području Slovenije (Kostanjšek i sur., 2019). Utvrđeno je da je mikrobna raznolikost na koži znatno niža nego u vodi u kojoj jedinke žive te da dominiraju porodice Sphingomonadaceae, Bradyrhizobiaceae, Burkholderiaceae, Microbacteriaceae i Flavobacteriaceae. Nadalje, uzgojeni su bakterijski izolati s površine ljuštura sjevernog dinarskog špiljskog školjkaša *C. jalzici* (Vuk, 2017). Izolati su identificirani sekvenciranjem *16S* rRNA gena i MALDI-TOF masenom spektrometrijom te je pokazano da dominiraju koljena Firmicutes s 71 %, Proteobacteria (razred Gammaproteobacteria) s 15 % i Actinobacteria s 12 %. Osim toga, količina vode u staništu utjecala je na sastav mikrobnih zajednica. Ovo je jedino postojeće istraživanje mikrobnih zajednica sesilnih stigobionata dinarskog krša, ali analiziran je samo biofilm ljuštura jedne od tri vrste špiljskih školjkaša i to uzgojem bakterija na jednom tipu hranjive podloge.

2 Cilj istraživanja

Osnovni cilj ovog rada bio je po prvi put opisati mikrobne zajednice sesilnih stigobionata sve tri vrste dinarskog špiljskog školjkaša (*C. jalzici*, *C. kusceri* i *C. mulaomerovici*) te dinarskog špiljskog cjevaša (*M. cavatica*). Pri tome je korišten pristup koji se temelji na izolaciji ukupne DNA i analizi sastava mikrobnih zajednica sekvenciranjem fragmenata gena koji kodiraju za *16S* rRNA gen.

Specifični ciljevi rada bili su:

- istražiti sastav i raznolikost mikrobnih zajednica dinarskih špiljskih školjkaša i mikrobnih zajednica s površine njihovih ljuštura te ih usporediti s okolišnim mikrobnim zajednicama iz vode,
- istražiti sastav i raznolikost mikrobnih zajednica dinarskog špiljskog cjevaša te ih usporediti s okolišnim mikrobnim zajednicama iz vode.

3 Materijal i metode

3.1 Područje istraživanja

Područje istraživanja bilo je podzemlje dinarskog krša, odnosno područje rasprostiranja ciljnih sesilnih filtratora iz rodova *Congeria* i *Marifugia*. Jedinke roda *Congeria* uzorkovane su na ukupno četiri različita lokaliteta tijekom tri godine (2018.-2020.) ovisno o vremenskim uvjetima, dostupnosti speleoloških objekata s obzirom na razinu vode te dostupnosti biospeleoloških timova koji su proveli uzorkovanje u speleološkim objektima.

Vrsta *C. jalzici* uzorkovana je u Lici na području Lipovog polja u dva ponora rijeke Like: ponor Dražice i Markov ponor. Ponor Dražice je smješten na krajnjem zapadnom dijelu Lipovog polja u području Dražice kod Donjeg Kosinja, dok se drugi i glavni ponor rijeke Like, Markov ponor, nalazi na jugozapadnom dijelu Lipovog polja. Vrsta *C. mulaomerovici* uzorkovana je na izvoru Oko koje se nalazi u Lušci polju kod mjesta Lušci palanka na sjeverozapadu Bosne i Hercegovine. Jedinke vrste *C. kusceri* uzorkovane su u Pukotini u tunelu Peračko Blato kod polja Jezero u kaverni s vodom koja je otvorena probijanjem tunela (**slika 2**).

Vrsta *M. cavatica* je uzorkovana na dva lokaliteta gdje se njezino rasprostiranje preklapa s populacijama roda *Congeria*: zajedno s jedinkama vrste *C. jalzici* u Markovom ponoru te s jedinkama vrste *C. kusceri* u Pukotini u tunelu Peračko Blato (**slika 2**).

Potrebne dozvole kao dopuštenja za izuzeće od zabranjenih radnji sa strogo zaštićenim vrstama *C. jalzici* i *C. kusceri* izdala je Uprava za zaštitu prirode Ministarstva zaštite okoliša i energetike Republike Hrvatske Institutu Ruđer Bošković i Hrvatskom biospeleološkom društvu, a za vrstu C. *mulaomerovici* tu je dozvolu izdalo Federalno ministarstvo okoliša i turizma Bosne i Hercegovine Hrvatskom biospeleološkom društvu. Biospeleolozi koji su sudjelovali na terenima: Jana Bedek, Helena Bilandžija, Magdalena Grgić, Ivica Jaklinović, Branko Jalžić, Alen Kirin, Nikolina Kuharić, Saša Minihofer, Ivana Mišerić, Martina Pavlek, Natalija Sudar i Vedran Sudar.

3.2 Uzorkovanje

Za potrebe ovog istraživanja, timovi biospeleologa uzorkovali su:

- jedinke školjkaša roda *Congeria*, vrste *C. jalzici*, *C. kusceri* i *C. mulaomerovici*,
- jedinke špiljskog cjevaša *Marifugia cavatica*,
- vodu.

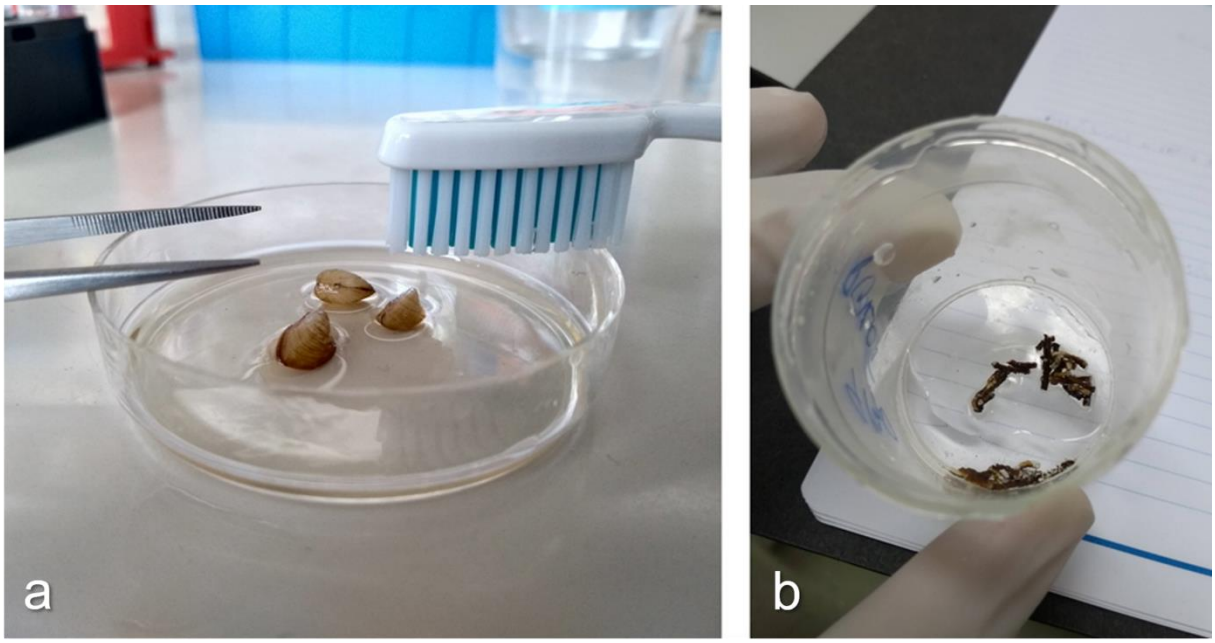
Pregled uzorkovanja nalazi se u **tablici 1**. Biospeleolozi su jedinke školjkaša i cjevaša sakupili žive u bočice ispunjene vodom s lokaliteta, dok su vodu na svakom lokalitetu prikupili u sterilne autoklavirane boce volumena 2 L. Sve uzorke su neposredno nakon terena transportirali na ledu do Laboratorija za biologiju i genetiku mikroorganizama na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje sam uzela uzorke obrisaka ljušture školjkaša, izolirala tkiva iz ljuštura školjkaša i cjevaša te profiltrirala vodu.

Tablica 1. Pregled uzorkovanja.

Lokalitet	Datum uzorkovanja	Vrsta	Tip uzorka	Broj replika	Kratica
Ponor Dražice, Lipovo polje, RH	10.11.2018.	*C. jalzici*	tkivo školjkaša	4	Cj18
			obrisak ljušture	4	obr_Cj18
		-	voda	6	vod_Cj18
Markov ponor, Lipovo polje, RH	15.8.2020.	*M. cavatica*	tkivo cjevaša	4	Mc_Cj20
		C. jalzici	obrisak ljušture	4	obr_Cj20
		-	voda	4	vod_Mc_Cj20
Pukotina u tunelu Polje Jezero, Peračko Blato, RH	30.7.2019.	*C. kusceri*	tkivo školjkaša	2	Ck19
			obrisak ljušture	3	obr_Ck19
	2.7.2020.	*M. cavatica*	tkivo cjevaša	4	Mc_Ck20
		C. kusceri	obrisak ljušture	4	obr_Ck20
		-	voda	4	vod_Mc_Ck20
Oko, Lušci polje, Lušci palanka, BiH	11.10.2018.	*C. mulaomerovici*	obrisak ljušture	4	obr_Cm18
		-	voda	5	vod_Cm18
	29.7.2019.	*C. mulaomerovici*	tkivo školjkaša	3	Cm19
			obrisak ljušture	3	obr_Cm19
		-	voda	5	vod_Cm19
				Ukupno 63	

Prilikom dolaska u laboratorij, sakupljene žive jedinke grupirala sam u 3-4 zasebna uzorka, odnosno replike (ovisno o ukupnom broju dostupnih jedinki na određenom lokalitetu). Obriske ljuštura školjkaša sam uzorkovala na način da sam grupe jedinki (3-8 školjkaša po uzorku) očetkala sterilnom četkicom za zube srednje tvrdoće u 2 mL vode (**slika 4a**). Tekućine s resuspendiranim biofilmom sam zatim prebacila u Eppendorf epruvete volumena 2 mL i onda ih centrifugirala 15 min pri 10 000 x g i 4 °C. Nakon toga sam uklonila supernatant i smrznula

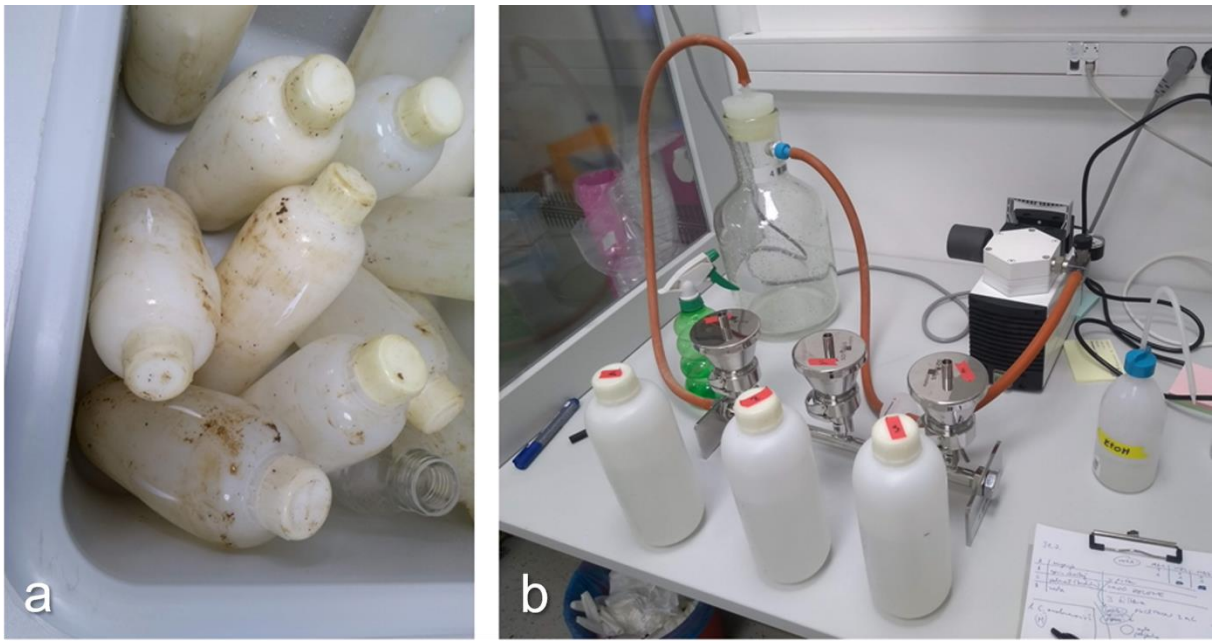
taloge na -20 °C. Biofilm vrste *M. cavatica* nije uzorkovan jer ga nije bilo moguće očetkati s vrlo sitnih i krhkih jedinki cjevaša (**slika 4b**).



Slika 4. (a) Jedinke roda *Congeria* (foto: M. Vuk). (b) Jedinke roda *Marifugia* (foto: M. Vuk).

Nakon uzorkovanja biofilma, izolirala sam tkivo iz ljuštura. Ljušture školjkaša sam otvorila sterilnim skalpelom te im tkivo odvojila od ljuštura, dok je Helena Bilandžija izdvojila tkivo cjevaša od ljuštura sterilnom pincetom uz pomoć lupe. Po tri jedinke školjkaša odnosno četiri jedinke cjevaša je činilo jedan uzorak tkiva (**slika 4**). Izolirana tkiva jedinki sam smrznula na -20 °C.

Vodu sam filtirala odmah pri dolasku u laboratorij (**slika 5**) na Combisart® (Sartorius) sustavu za filtraciju i filtera Whatman® s veličinom pora 0,2 µm (GE Healthcare) uz povremenu pomoć Ane Bielen. Kroz pojedini filter profiltirano je 2-3 L vode, do začepljenja filtera. Nakon filtracije, filtere sam pohranila u sterilne Falcon epruvete volumena 50 mL i odmah smrznula na -20 °C.



Slika 5. (a) Boce u laboratoriju nakon uzorkovanja (foto: M. Vuk). (b) Aparatura s filtracijom u tijeku (foto: M. Vuk).

3.3 Izolacija DNA

DNA iz uzoraka sam izolirala kompletom NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel) prema uputama proizvođača uz modifikacije. Tkiva jedinki i filtere s mikrobnom biomasom sam prije izolacije dodatno usitnila sterilnim skalpelima i premjestila u tubicu NucleoSpin® Bead Tube Type B. Biomasi je dodano 100-200 µL pufera BE te je tkivo lizirano uz potresanje na uređaju Vortex Mixer (Corning) kroz 20 min pri srednjoj jačini. DNA je s kolone eluirana dva puta i to tako da je prvi eluat korišten za drugu eluaciju kako bi se povećao prinos i koncentracija konačnog uzorka.

3.4 Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza je metoda razdvajanja fragmenata nukleinskih kiselina prema veličini pod utjecajem istosmjernog električnog polja pri čemu se kraći DNA fragmenti kreću brže od dužih (Lee i sur., 2012). U ovom sam radu koristila elektroforezu u 1%-tnom agaroznom gelu za provjeru količine DNA u uzorcima.

Agarozu (Sigma-Aldrich) sam otopila u TAE puferu (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1 mM EDTA) te sam joj dodala boju GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza) za vizualizaciju fragmenata DNA. Molekule DNA razdvojene su u električnom polju napona 100 V u TAE

puferu kroz 45 minuta. Nakon toga sam ih vizualizirala i fotografirala pod UV-svjetlom (UVIpure transiluminator, UVITEC Cambridge). Za provjeru veličine dobivenih fragmenata koristila sam molekularni biljeg DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich).

Uzorke s vrlo niskom koncentracijom DNA sam dodatno koncentrirala na aparatu SpeedVac (Savant SPD2010 SpeedVac Concentrator) kroz 30 min pri 20 mbar i 40 °C.

3.5 Sekvenciranje, bioinformatička i statistička obrada

Ukupno 63 uzorka izolirane ukupne DNA iz vode, obrisaka i tkiva poslano je na Illumina MiSeq sekvenciranje V4 regije *16S* rRNA gena uz pročišćavanje i umnožavanje lančanom reakcijom polimerazom početnicama 515F i 806R (komercijalni servis Microsynth AG, Švicarska). Sekvence su isporučene nakon demultipleksiranja (uklanjanja barkodova koji označavaju određeni uzorak u smjesi više uzoraka) i uklanjanja zaostalih Illumina adaptera.

Za obradu sekvenci koristila sam bioinformatičku platformu QIIME2 2021.2 (Bolyen i sur., 2019) na računalnom klasteru Isabella (Sveučilišni računski centar Sveučilišta u Zagrebu) koristeći PuTTY 0.74 kao SSH klijent i WinSCP 5.19.5 za pregledniji pristup datotekama.

3.5.1 Pretprocesiranje

Pretprocesiranje podrazumijeva pretvorbu sirovih demultipleksiranih sekvenci u formatu *fastq* u format *qza* prikladan za platformu QIIME2. Provela sam ga naredbom u kojoj se navodi tip uzorka te *manifest_file.txt* koji spaja nazive uzoraka s njihovim lokacijama na računalu. Rezultat je datoteka *demux.qza*. Većinu *qza* formata bilo je potrebno naredbama vizualizirati u format *qzv* koji je moguće prikazati na web stranici qiime2view (https://view.qiime2.org/) i po potrebi očitati podatke potrebne za daljnji tijek obrade i prikaza rezultata.

3.5.2 Pročišćavanje sekvenci od grešaka i šumova

Pročišćavanje sekvenci sam odradila naredbom DADA2 koja obavlja dereplikaciju i filtriranje smetnji. Dereplikacija uključuje identifikaciju višestrukih jedinstvenih sekvenci koje se onda sažimaju zajedno što kasnije znatno smanjuje vrijeme potrebno za računalnu obradu podataka, dok se filtriranje smetnji odnosi na uklanjanje kraćih sekvenci i sekvenci lošije kvalitete koje se smatraju greškama u sekvenciranju (Callahan i sur., 2016).

Naredbom se mogu spojiti uzvodne (engl. *forward*) i nizvodne (engl. *reverse*) sekvence, no u ovom su radu sam koristila samo uzvodne sekvence jer su bile bolje kvalitete od nizvodnih pa bi spajanje smanjilo broj očitanja po uzorku. Osim toga, uzvodne sekvence u potpunosti

pokrivaju V4 regiju. Sekvencama sam uklonila početnicu 515F i sve sam ih izrezala na duljinu od 253 parova baza (pb) što se smatra prosječnom duljinom V4 regije. U ovoj fazi obrade dodala sam i tablicu s opisnim podacima za svaki uzorak (*metadata.txt*) kako bi se na temelju toga uzorci mogli filtrirati u daljnjoj obradi.

Zatim sam iz podataka uklonila rijetke sekvence, odnosno one koje su se pojavile u samo jednom uzorku i one koje imaju nizak ukupan broj pojavljivanja u cijelom setu podataka (≤ 46), budući da se takve sekvence mogu smatrati greškom sekvenciranja.

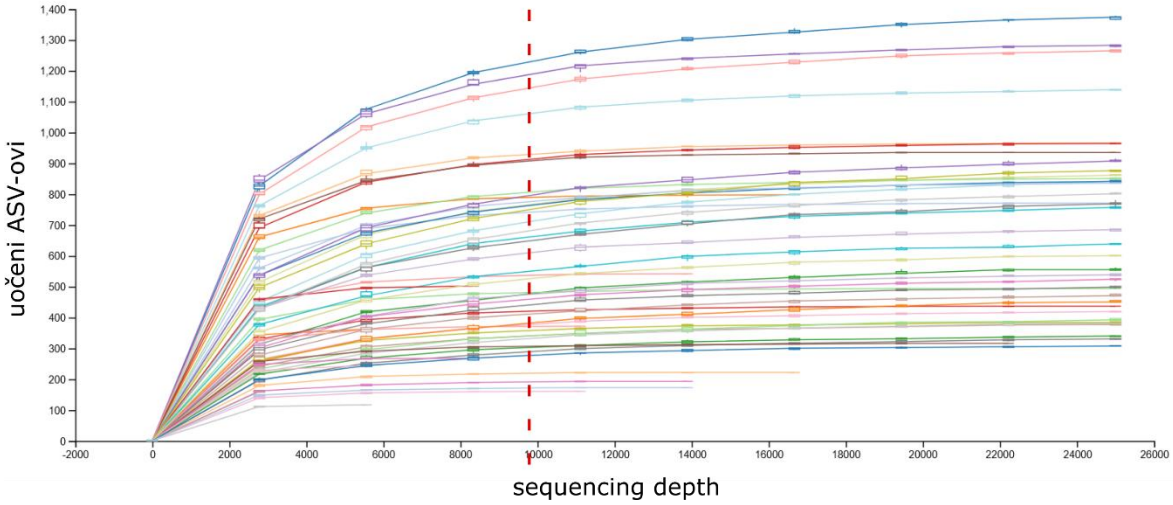
3.5.3 Filtriranje nebakterijskih taksona i taksonomska raznolikost

Taksonomska baza koju sam koristila u ovom radu je Greengenes 13.8 (McDonald i sur., 2012), koju sam istrenirala na V4 regiju, tj. čitavu bazu sam izrezala po mjeri te regije (Bokulich i sur., 2018; Pedregosa i sur., 2011). Nakon taksonomske klasifikacije sekvenci u nekim uzorcima uočila sam nebakterijske taksone, odnosno kloroplastne i mitohondrijske sekvence, koje sam izuzela iz daljnje obrade.

Taksonomiju filtriranog seta podataka ponovno sam odredila istreniranim klasifikatorom te su napravljeni grafički prikazi udjela pojedinih taksona na nivou koljena i porodice. Za bolju preglednost najzastupljenijih, manje zastupljeni taksoni (< 3 % za razinu koljena, < 5 % za razinu porodice) sam svrstala zajedno pod grupu *ostali*.

3.5.4 Priprema za statističku obradu

Statističku obradu sam započela izradom filogenetskog stabla koje je preduvjet za daljnje analize (Katoh i Standley, 2013; Price i sur., 2010). Na temelju ukorijenjene verzije stabla odradila sam alfa rarefakciju (**slika 6**). Tijekom alfa rarefakcije iz uzoraka se nasumično uzimaju sekvence te se određuje broj različitih varijanti amplikonskih sekvenci (ASV, engl. *amplicon sequence variant*). Porastom broja sekvenci uzetih po uzorku očekuje se zasićenje, tj. da krivulje dosegnu plato što znači da se dodatnim povećanjem broja sekvenci, odnosno dubine uzorkovanja (engl. *sampling depth*) ne očekuje i povećanje raznolikosti. Potrebno je odabrati što veću dubinu uzorkovanja, a da se istovremeno izgubi što manji broj uzoraka. U ovom radu odabrala sam dubina uzorkovanja od 9777 sekvenci po uzorku te sam nju koristila u daljnjim statističkim obradama alfa i beta raznolikosti. Nakon cijelog postupka s ukupno 63 replika uzoraka, njihov konačni broj u ovom radu je 47 s obzirom na to da uzorci koji su sadržavali manje od 9777 sekvenci nisu uključeni u daljnje analize.



Slika 6. Krivulje alfa raznolikosti nakon alfa rarefakcije. Crvena isprekidana linija predstavlja odabranu dubinu uzorkovanja (9777).

3.5.5 Alfa raznolikost

Testovi alfa raznolikosti ispituju koji se ASV-ovi nalaze unutar pojedine skupine te određuju njihovu raspodjelu i bogatstvo unutar skupine. Za svaki tip uzorka (tkivo školjkaša, obrisak ljušture školjkaša, tkivo cjevaša, voda) sam pomoću bioinformatičkih alata na platformi QIIME2 odredila broj uočenih ASV-ova te Pielouov indeks ujednačenosti koji pokazuje koliko su ravnomjerno zastupljeni ASV-ovi u pojedinom uzorku. Za primjer, vrijednost tog indeksa 1 upućuje na to da su sve vrste uzorku jednako zastupljene. Suprotno tome, vrijednost približna nuli upućuje na to da jedna vrsta snažno dominira.

3.5.6 Beta raznolikost

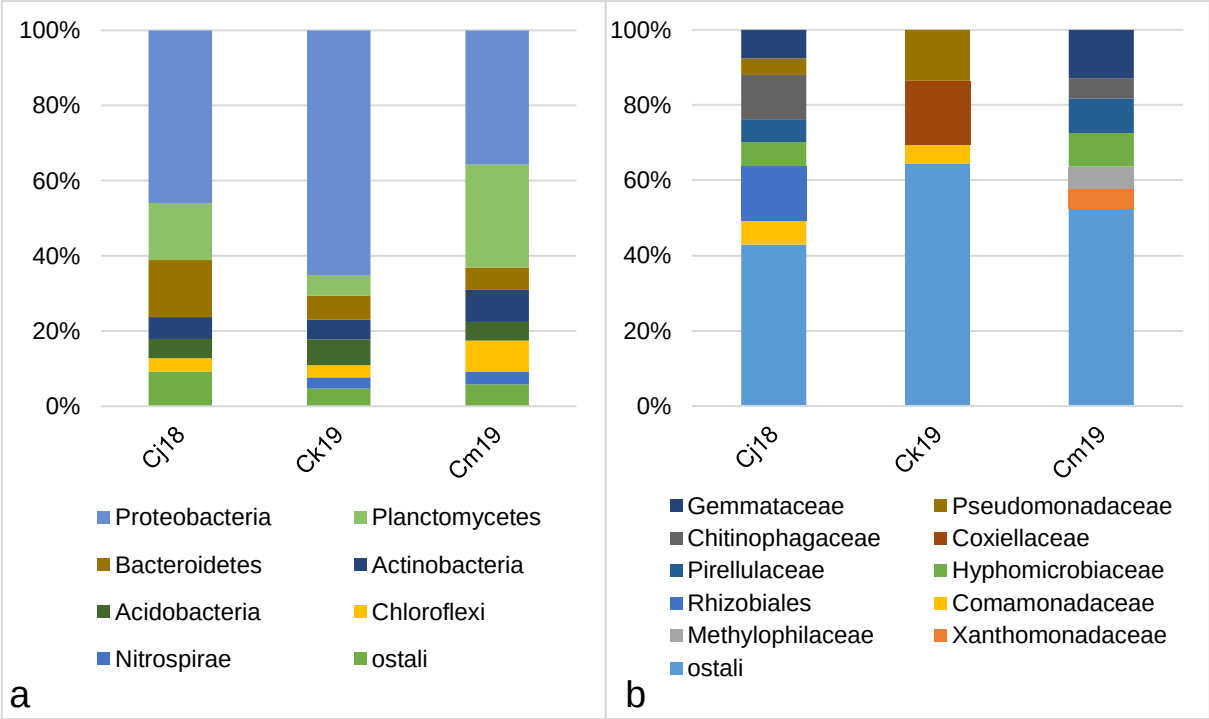
Testovi beta raznolikosti ispituju odnose između pojedinih uzoraka. Provela sam netežinsku i težinsku UniFrac metodu koje mjere filogenetske udaljenosti između različitih ASV-ova unutar ukorijenjenog filogenetskog stabla sa svim uzorcima. Netežinski UniFrac ima binarni pristup i u obzir uzima samo je li određeni ASV prisutan ili odsutan u uzorku, dok težinski uzima u obzir i zastupljenost svakog ASV-a pa tako svakoj filogenetskoj grani dodaje težinu. Sve uzorke u radu sam usporedila zajedno te sam ih prikazala metodom glavnih koordinata (PCoA, engl. *principal coordinates analysis*) u matricama UniFrac udaljenosti. To je statistička metoda koja smješta udaljenosti između stavki u trodimenzionalni koordinatni sustav gdje je onda moguće grafički prikazati grupiranja uzoraka.

4 Rezultati

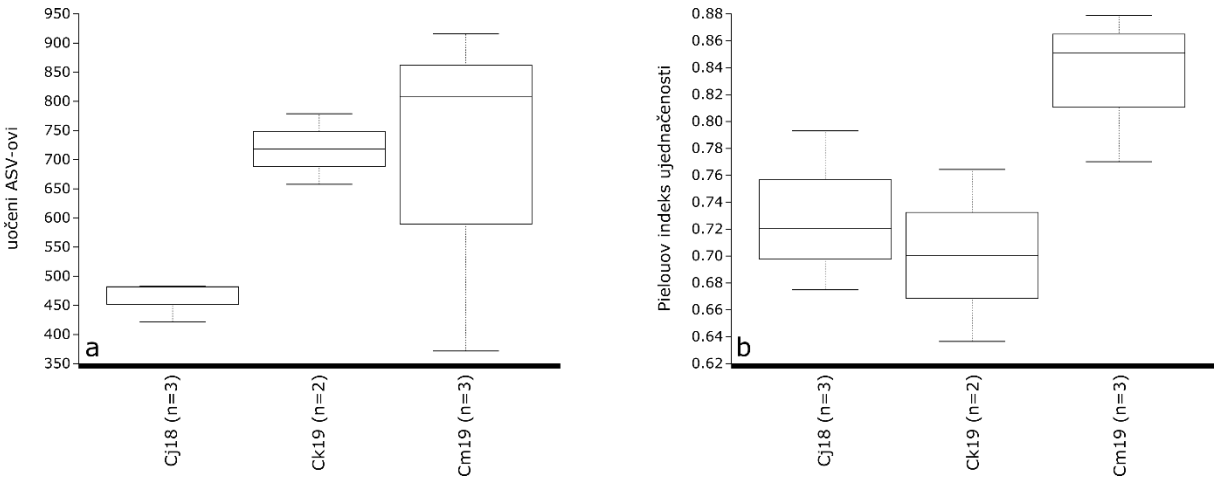
4.1 Taksonomska i alfa raznolikost

Nakon cjelovite obrade seta podataka, ukupan broj sekvenci bio je 2 523 535 sa 667 različitih ASV-ova u ukupno 47 uzorka. Ukupno je detektirano 43 bakterijska koljena i 373 porodice.

U tkivima sve tri vrste školjkaša iz roda *Congeria* najzastupljenije je bilo koljeno Proteobacteria (45 % za *C. jalzici*; 65 % za *C. kusceri*; 35 % za *C. mulaomerovici*) (**slika 7a**), a nakon toga koljena Planctomycetes i Bacteroidetes. Porodice koljena Proteobacteria činile su čak sedam od deset porodica koje su bile zastupljene s više od 5 % u uzorcima: Pseudomonadaceae, Coxiellaceae, Hyphomicrobiaceae, nepoznata porodica iz reda Rhizobiales, Comamonadaceae, Methylophilaceace i Xanthomonadaceae redom po ukupnoj zastupljenosti u kategoriji (**slika 7b**). Prosječan broj ASV-ova u tkivima školjkaša bio je između 461 (Cj18) i 717 (Cm19), a Pielouov indeks ujednačenosti između 0,70 (Ck19) i 0,85 (Cm19), bez statistički značajnih razlika između vrsta (**slika 8**).

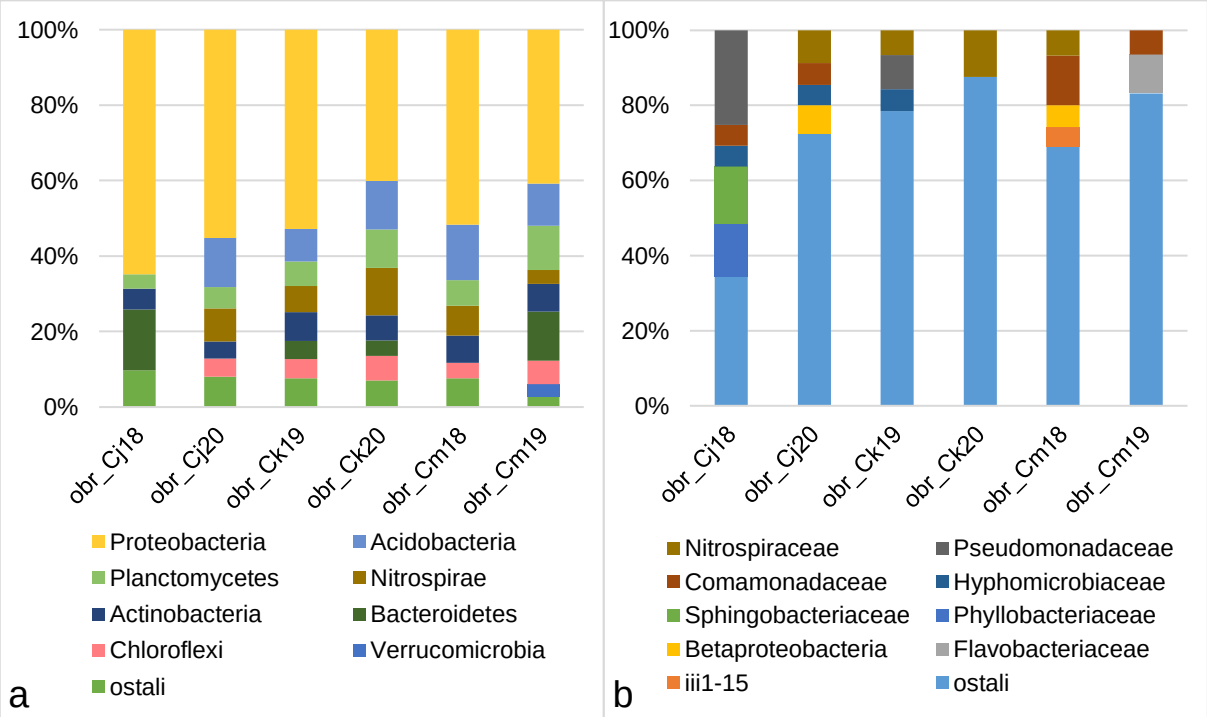


Slika 7. Bakterijski taksoni prisutni u tkivima školjkaša na razini koljena (a) i porodice (b). Prikazana su koljena zastupljenosti ≥ 3 % i porodice zastupljenosti ≥ 5 %, dok su ona s manjom zastupljenošću grupirana u kategoriju *ostali*. Cj18 – tkivo vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. Ck19 – tkivo vrste *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2019. Cm19 – tkivo vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019.

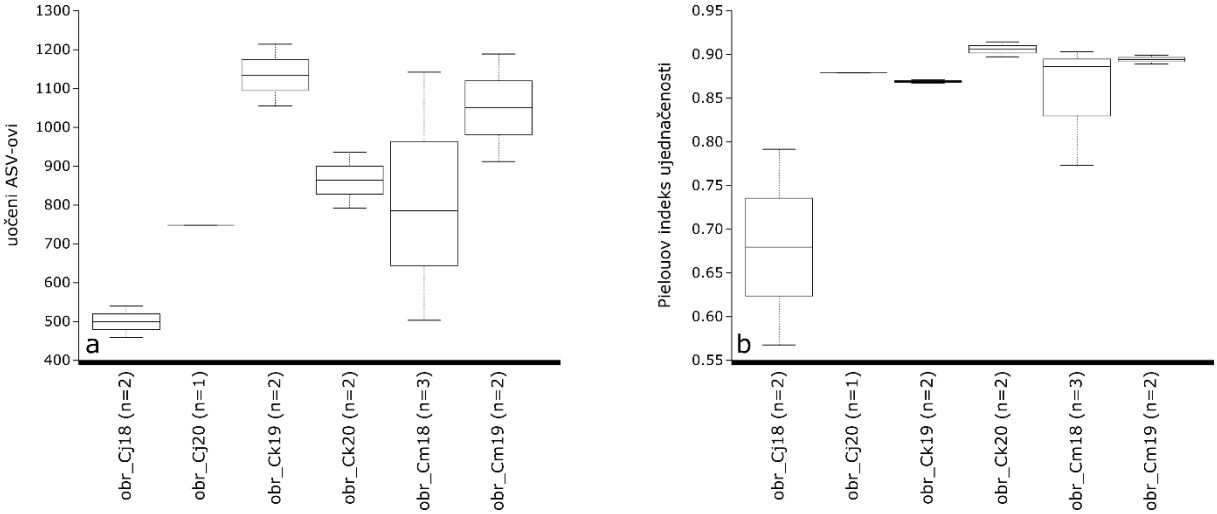


Slika 8. (a) Broj uočenih bakterijskih ASV-ova u tkivima školjkaša. (b) Pielouov indeks ujednačenosti u tkivima školjkaša. Cj18 – tkivo vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. Ck19 – tkivo vrste *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2019. Cm19 – tkivo vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019.

Koljeno Proteobacteria također je bilo najzastupljenije u obriscima ljuštura školjkaša (od 35 do 65 % u uzorcima) (**slika 9a**). Osim Proteobacteria, ostala visoko zastupljena koljena bila su Planctomycetes, Bacteriodetes, Actinobacteria, Acidobacteria i Chloroflexi. U obriscima ljuštura školjkaša detektiran je veliki broj različitih porodica, uglavnom sa zastupljenošću manjom od 5 % (**slika 9b**). Prosječan broj ASV-ova u obriscima školjkaša bio je između 498 (obr_Cj18) i 1133 (obr_Ck19), a Pielouov indeks ujednačenosti između 0,68 (obr_Cj18) i 0,89 (obr_Ck20), bez statistički značajnih razlika između vrsta/uzorkovanja (**slika 10**).

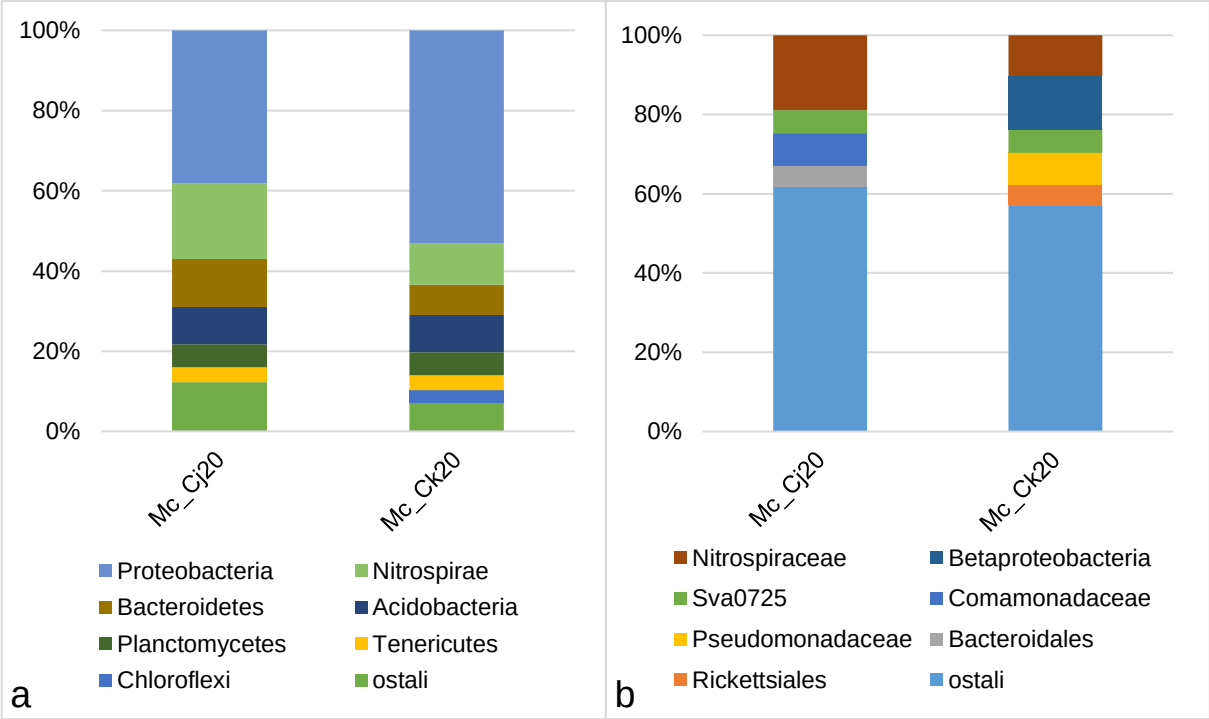


Slika 9 Bakterijski taksoni prisutni u obriscima ljuštura školjkaša na razini koljena (a) i porodice (b). Prikazana su koljena zastupljenosti ≥ 3 % i porodice zastupljenosti ≥ 5 %, dok su ona s manjom zastupljenošću grupirana u kategoriju *ostali*. obr_Cj18 – obrisak vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. obr_Cj20 – obrisak vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. obr_Ck19 – obrisak vrste *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2019. obr_Ck20 – obrisak vrste *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020. obr_Cm18 – obrisak vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2018. obr_Cm19 – obrisak vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019.

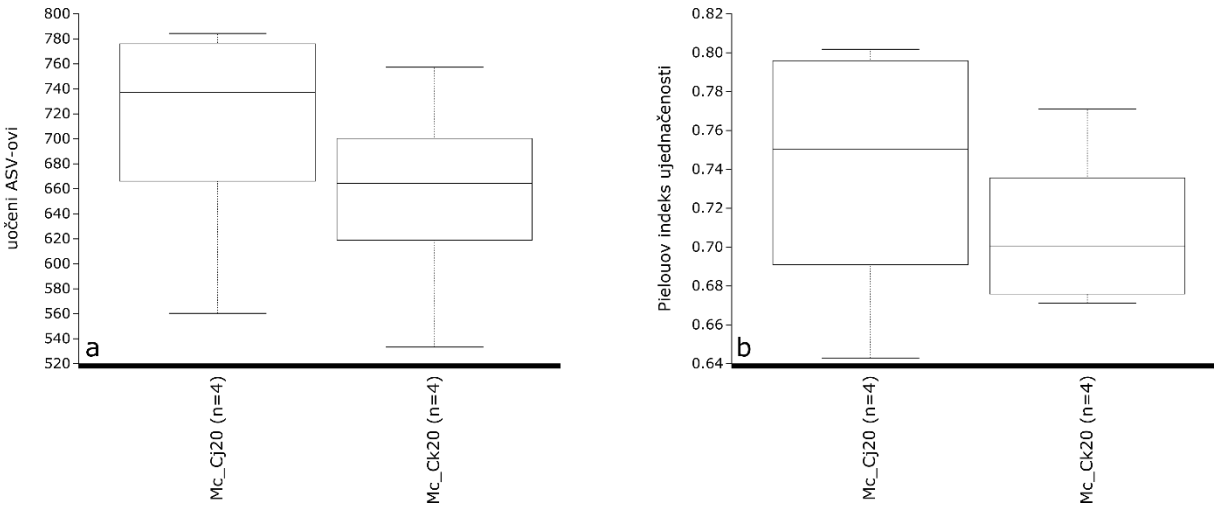


Slika 10. (a) Broj uočenih ASV-ova u obriscima ljuštura školjkaša. (b) Pielouov indeks ujednačenosti u obriscima ljuštura školjkaša. obr_Cj18 – obrisak vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. obr_Cj20 – obrisak vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. obr_Ck19 – obrisak vrste *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2019. obr_Ck20 – obrisak vrste *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020. obr_Cm18 – obrisak vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2018. obr_Cm19 – obrisak vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019.

U tkivu cjevaša također je bilo dominantno koljeno Proteobacteria (38 % s lokaliteta Markov ponor; 53 % s lokaliteta Pukotina) kao i kod tkiva školjkaša te nakon njega koljena Nitrospirae, Bacteroidetes, Acidobacteria i Planctomycetes (**slika 11a**). Kao i kod drugih tipova uzoraka, i ovdje je bio prisutan velik broj porodica zastupljenih s < 5 %. Najzastupljenija porodica bila je Nitrospiraceae (koljeno Nitrospirae), a nakon nje neimenovana porodica iz razreda Betaproteobacteria pa Comamonadaceae, Pseudomonadaceae i neimenovana porodica iz reda Rickettsiales (koljeno Proteobacteria) (**slika 11b**). Mikrobne zajednice uzorka Mc_Cj20 imale su veću raznolikost (prosječan broj ASV-ova 738 naspram 654) i ujednačenost (prosječan Pielouov indeks 0,75 naspram 0,70) od uzorka Mc_Ck20, no razlika nije bila statistički značajna (**slika 12**).

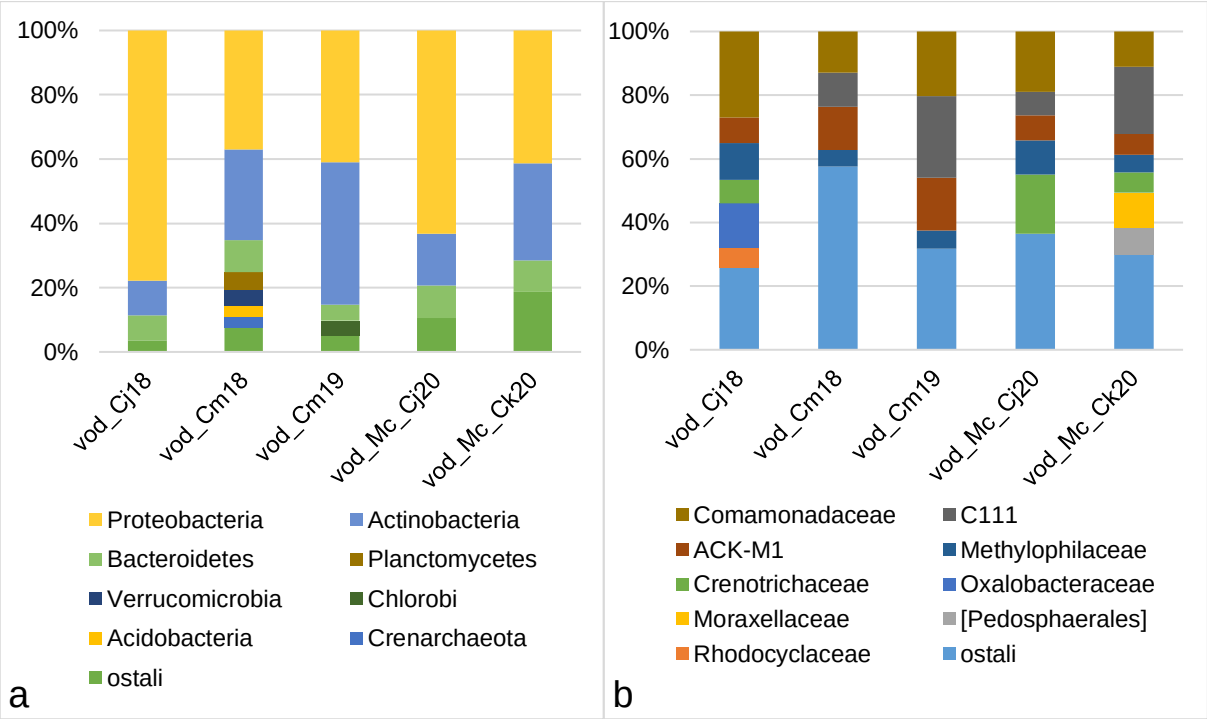


Slika 11. Bakterijski taksoni prisutni u tkivima cjevaša na razini koljena (a) i porodice (b). Prikazana su koljena zastupljenosti ≥ 3 % i porodice zastupljenosti ≥ 5 %, dok su ona s manjom zastupljenošću grupirana u kategoriju *ostali*. Mc_Cj20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. Mc_Ck20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020.

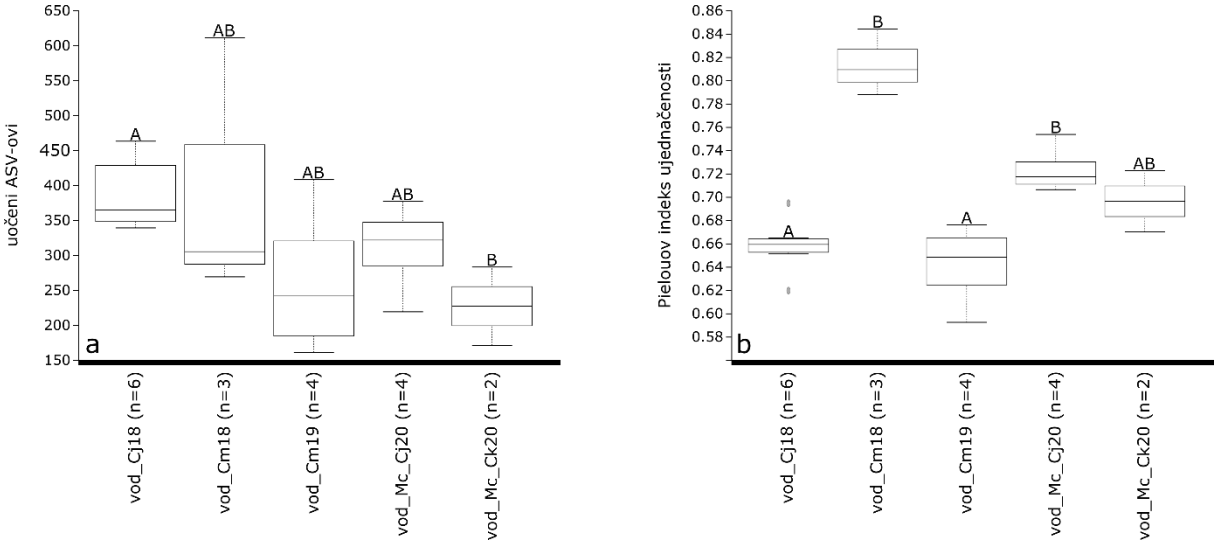


Slika 12. (a) Broj uočenih ASV-ova u tkivima cjevaša. (b) Pielouov indeks ujednačenosti u tkivima cjevaša. Mc_Cj20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. Mc_Ck20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020.

I u uzorcima vode prevladavalo je koljeno Proteobacteria sa šest od devet najzastupljenijih porodica (≥ 5 %) (**slika 13**). Osim toga, bilo je značajno zastupljeno i koljeno Actinobacteria kojem pripadaju dvije vrlo zastupljene porodice C111 i ACK-M1. Prosječan broj ASV-ova u uzorcima vode bio je između 227 (vod_Mc_Ck20) i 395 (vod_Cj18), a Pielouov indeks ujednačenosti između 0,64 (vod_Cm19) i 0,81 (vod_Cm18). Statistički značajne razlike među uzorcima postoje te su njihovi odnosi prikazani na **slici 14**.



Slika 13. Bakterijski taksoni prisutni u uzorkovanoj vodi na razini koljena (a) i porodice (b). Prikazana su koljena zastupljenosti ≥ 3 % i porodice zastupljenosti ≥ 5 %, dok su ona s manjom zastupljenošću grupirana u kategoriju *ostali*. vod_Cj18 – voda u staništu vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm18 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm19 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019. vod_Mc_Cj20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. vod_Mc_Ck20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020.



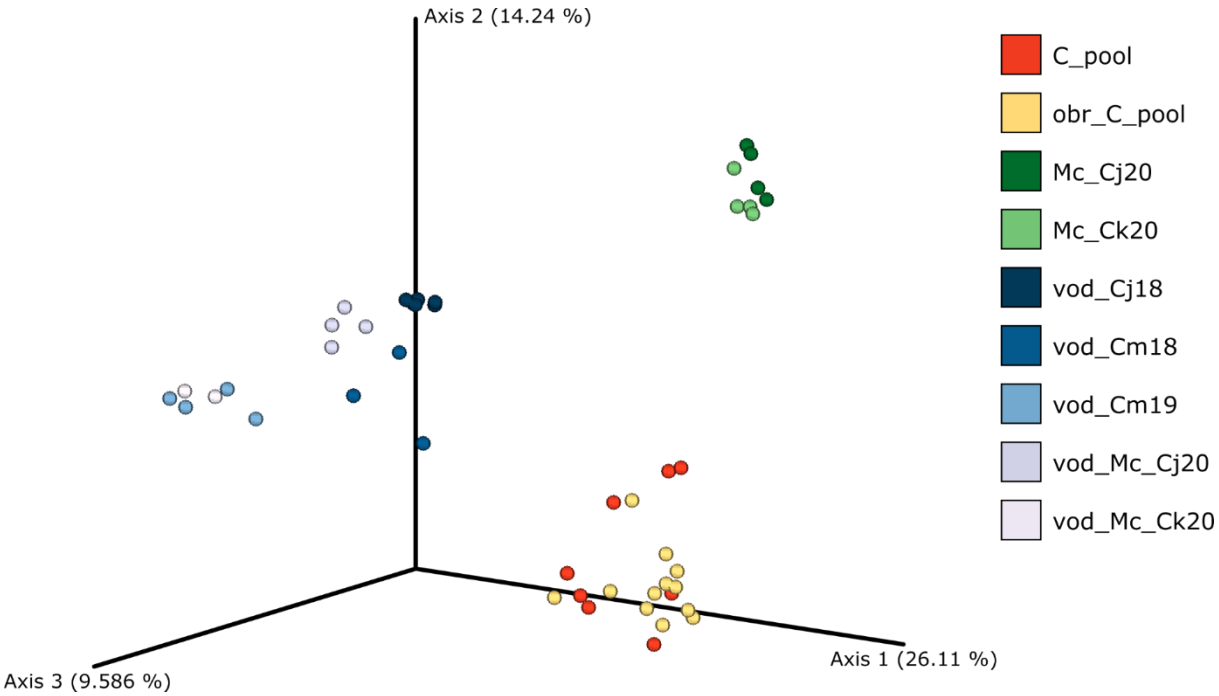
Slika 14. (a) Broj uočenih ASV-ova u uzorcima vode. (b) Pielouov indeks ujednačenosti u uzorcima vode. Statistički značajno različite grupe (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0{,}05$) označene su različitim slovima. vod_Cj18 – voda u staništu vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm18 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm19 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019. vod_Mc_Cj20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. vod_Mc_Ck20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020.

Najveći prosječan broj ASV-ova, 821, uočen je u skupini obrisaka ljuštura školjkaša. To je također bila skupina s najvišim prosječnim Pielouovim indeksom ujednačenosti koji je iznosio 0,88. Najmanji prosječan broj ASV-ova (316) i najniži Pielouov indeks ujednačenosti (0,71) imali su uzorci vode. Tkiva školjkaša i cjevaša imala su slične prosječne vrijednosti broja ASV-ova (625 odnosno 680) i Pielouovih indeksa ujednačenosti (0,75 odnosno 0,73).

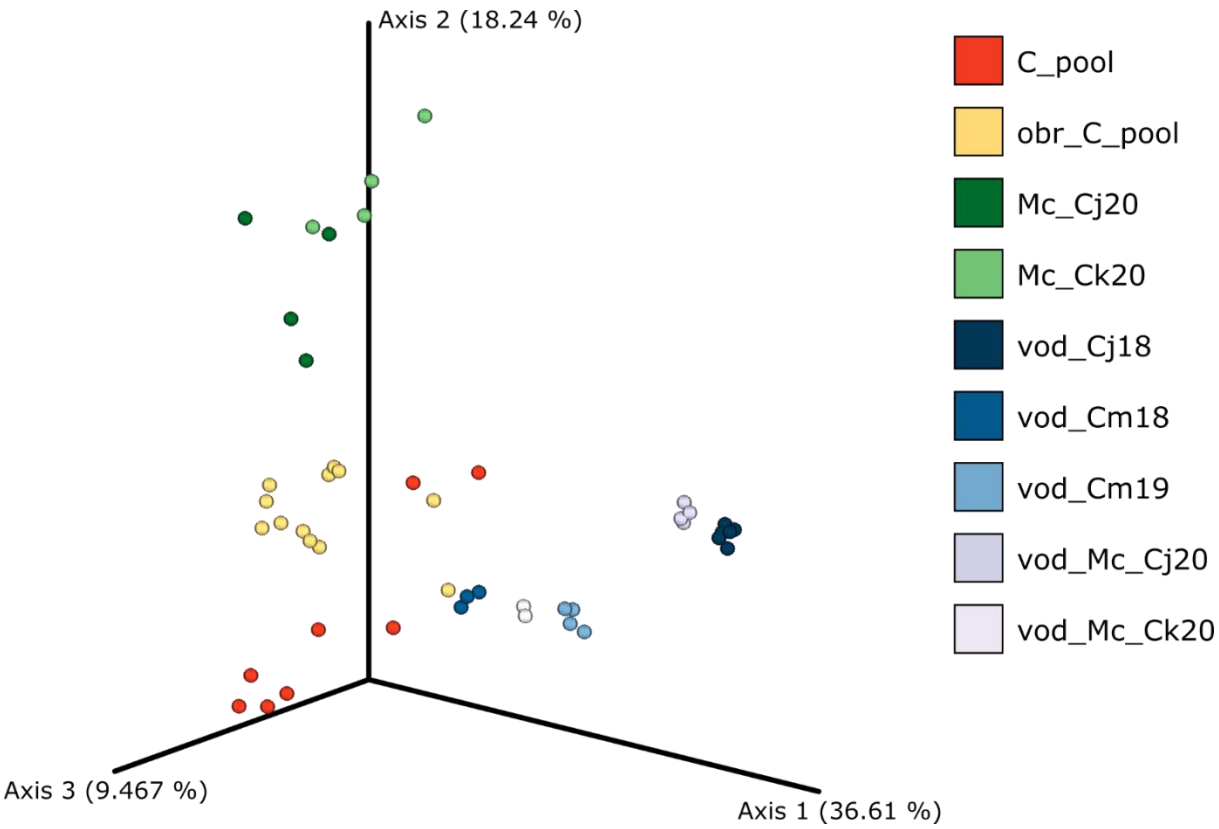
4.2 Beta raznolikost

Mikrobne zajednice tkiva cjevaša s različitih lokacija statistički su se značajno razlikovale ovisno o lokaciji, kao i većina uzoraka vode i za netežinsku i za težinsku UniFrac analizu (**prilozi 1** i **2**). Nasuprot tome, mikrobne zajednice tkiva školjkaša i njihovih obrisaka nisu se međusobno značajno razlikovale, ni ovisno o lokaciji/uzorkovanju ni ovisno o vrsti te su za potrebe grafičkih prikaza i daljnjih analiza spojene u zajedničke kategorije nazvane C_pool za uzorke tkiva školjkaša odnosno obr_C_pool za uzorke obrisaka školjkaša (**slike 15** i **16**).

Beta raznolikost svih tipova uzoraka analizirana je netežinskom i težinskom UniFrac metodom (**slike 15** i **16**; **prilozi 1** i **2**) te su objema analizama dobiveni slični rezultati, odnosno statistički značajno grupiranje mikrobnih zajednica ovisno o tipu uzorka: tkiva školjkaša, obrisci, tkiva cjevaša i voda. Mikrobne zajednice tkiva i obrisaka školjkaša činile su dvije statistički značajno različite, ali relativno bliske grupe, pogotovo u netežinskom UniFrac pristupu (**slika 15**) što znači da dijele velik broj sličnih taksona. Mikrobne zajednice tkiva cjevaša činile su drugu dobro definiranu grupu i u netežinskom i u težinskom prikazu, unutar koje su mikrobne zajednice s različitih lokaliteta bile statistički značajno različite (**slika 15** i **16**). Naposlijetku, mikrobne zajednice iz uzoraka vode činile su dobro definiranu skupinu, iako su se pojedini uzorci statistički značajno razlikovali od drugih, primjerice vod_Cj18 i vod_Mc_Cj20 (**prilozi 1** i **2**).



Slika 15. Prikaz beta raznolikosti netežinskom UniFrac metodom. C_pool – tkiva roda *Congeria*, sva uzorkovanja. obr_C_pool – obrisci roda *Congeria*, sva uzorkovanja. Mc_Cj20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. Mc_Ck20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020. vod_Cj18 – voda u staništu vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm18 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm19 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019. vod_Mc_Cj20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. vod_Mc_Ck20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020.



Slika 15. Prikaz beta raznolikosti težinskom UniFrac metodom. C_pool – tkiva roda *Congeria*, sva uzorkovanja. obr_C_pool – obrisci roda *Congeria*, sva uzorkovanja. Mc_Cj20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. Mc_Ck20 – tkivo vrste *Marifugia cavatica* na staništu gdje je i vrsta *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020. vod_Cj18 – voda u staništu vrste *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm18 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2018. vod_Cm19 – voda u staništu vrste *Congeria mulaomerovici*, uzorkovanje 2019. vod_Mc_Cj20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria jalzici*, uzorkovanje 2020. vod_Mc_Ck20 – voda u staništu vrsta *Marifugia cavatica* i *Congeria kusceri*, uzorkovanje 2020.

5 Rasprava

U ovome je radu po prvi puta metagenomskim pristupom istražena struktura i raznolikost mikrobnih zajednica sesilnih špiljskih organizama dinarskoga krša i njihovog okoliša. Uzorkovane su mikrobne zajednice tkiva školjkaša sve tri vrste iz roda *Congeria,* njihov obraštaj ljušture, tkiva cjevaša *M. cavatica* i voda kao njihov okoliš.

Sastav mikrobnih zajednica vode dobiven ovim istraživanjem u podzemnim lokacijama dinarskog krša u RH i BiH usporediv je s rezultatima istraživanja Kostanjšeka i suradnika (2019) koji opisuju mikrobne zajednice podzemnih voda slovenskog dijela dinarskog krškog podzemlja. Dominantno koljeno u oba istraživanja bilo je koljeno Proteobacteria.

Od 309 porodica zabilježenih u ovom istraživanju u uzorcima vode, porodica Comamonadaceae bila je među najzastupljenijima (27 %) što je u suprotnosti s istraživanjem, Kostanjšeka i suradnika (2019) koji su naveli kako niti jedna od prisutnih 96 porodica ne dominira u uzorku.

Mikrobne zajednice različitih uzoraka vode s različitih lokacija i prikupljene u različitim sezonama bile su međusobno statistički značajno različite. To se može objasniti time da podzemne vode značajno variraju ovisno o procjednim vodama, godišnjem dobu, količini oborina, otapanju snijega i količini hranjivih tvari. Iako su uvjeti u špiljama općenito stalni i konstantni, svako područje pa i skoro svaki speleološki objekt ima neke specifičnosti, poput razlika u dinamici priljeva i kvaliteti procjednih voda te u mikroklimi koja ovisi i o morfologiji objekta. S obzirom da je poznato da se sastav mikrobnih zajednica u vodi brzo mijenja ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima vode (Retter i sur., 2021), može se pretpostaviti da su takve promjene doprinijele zabilježenim razlikama. Međutim, fizikalno-kemijski parametri vode u ovom radu nisu mjereni i potrebna su dodatna istraživanja kako bi se oni mogli povezati sa sastavom akvatičkih mikrobnih zajednica u dinarskom krškom podzemlju.

Što se tiče mikrobnih zajednica sesilnih špiljskih filtratora, uvjerljivo su dominirali pripadnici koljena Proteobacteria što je zapaženo i kod drugih vodenih beskralježnjaka (Cheung i sur., 2015; Dragičević i sur., 2021; Givens i sur., 2013; Lokmer i Mathias Wegner, 2015; Ooi i sur., 2019; Shui i sur., 2020).

U ovom radu su prvi podaci o mikrobnim zajednicama vrste *M. cavatica* i općenito prvi podaci o mikrobnim zajednicama slatkovodnih pripadnika porodice Serpulidae. Međutim, dobiveni sastav mikrobnih zajednica relativno je sličan mikrobiomu morskog cjevaša *Hydroides elegans*

Haswell, 1883 (Vijayan i sur., 2019). Kod obje vrste prevladavaju pripadnici koljena Proteobacteria, a prisutna su i zajednička koljena Nitrospirae, Bacteriodetes, Acidobacteria i Planctomycetes. Nadalje, u ovom je istraživanju utvrđena statistički značajna razlika između mikrobnih zajednica tkiva vrste *M. cavatica* s različitih lokacija od kojih je jedna u Lici, a druga na samom jugu Hrvatske što ukazuje na to kako bi okoliš odnosno potencijalno različiti klimatološki uvjeti mogli utjecati na strukturu te posebice na abundanciju mikrobnih zajednica ove vrste (značajne razlike u težinskoj UniFrac analizi). Potrebna su dodatna istraživanja koja bi povezala zabilježene razlike mikrobnih zajednica vrste *M. cavatica* sa specifičnim uvjetima u okolišu, zdravstvenim i kondicijskim stanjem jedinki domaćina pa čak i genotipom domaćina koji bi se također mogao razlikovati između ove dvije lokacije.

Opisane mikrobne zajednice obrisaka ljušture školjkaša predstavljaju također prve podatke ovog tipa s obzirom na to da se jedino ranije istraživanje bakterija s površine ljušture vrste *C. jalzici* iz Markovog ponora baziralo na uzgoju bakterijskih izolata na neselektivnoj bogatoj hranjivoj podlozi (Vuk, 2017). U tom istraživanju prevladavali su brzorastući pripadnici koljena Firmicutes, a osim njih je nađeno vrlo malo spororastućih bakterija iz koljena Actinobacteria, Bacteriodetes i Proteobacteria. U usporedbi s navedenim istraživanjem, metagenomskim pristupom korištenim u ovom radu su na površini ljuštura roda *Congeria* identificirane sekvence koje su pripadale u čak 28 različitih bakterijskih koljena.

U ovom su radu prvi put analizirane mikrobne zajednice svih vrsta roda *Congeria*. Sve tri analizirane vrste potječu od iste ishodišne vrste, a pretpostavljeni razlozi njihovog razdvajanja, odnosno specijacije su geografska izolacija i razlike u mikrostaništima (Bilandžija i sur., 2013). Međutim, za razliku od mikrobnih zajednica tkiva špiljskih cjevaša koje su se razlikovale ovisno o lokaciji unutar iste vrste, u ovom radu nisu utvrđene statističke značajne razlike između mikrobnih zajednica različitih vrsta roda *Congeria*. Uzrok tome može biti mali broj uzorkovanih jedinki, razumljiv s obzirom na teško dostupno stanište i ugroženost ciljnih vrsta. Kako bi se sa sigurnošću utvrdilo da li postoje vrsno-specifične mikrobne zajednice kod roda *Congeria*, potrebno je provesti daljnja istraživanja u kojima bi se uzorkovao veći broj jedinki na većem broju lokaliteta. U prilog postojanju vrsno-specifičnih mikrobioma govori činjenica da je mikrobiom svake od tri vrste dinarskog špiljskog školjkaša sadržavao barem jednu porodicu koja je kod druge dvije vrste bila ili značajno manje zastupljena ili je nije bilo. Na primjer, kod vrste *C. jalzici* dominirala je neidentificirana porodica razreda Rhizobiales (14 %), dok su u tkivu vrste *C. kusceri* prevladavale Pseudomonadaceae i Coxiellaceae koje gotovo uopće nisu bile prisutne u preostale dvije vrste školjkaša.

Mikrobne zajednice roda *Congeria* zabilježene ovim istraživanjem djelomično su se podudarale i s mikrobnim zajednicama nadzemnog srodnog slatkovodnog školjkaša vrste *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771, pripadnika iste porodice Dreissenidae (Mathai i sur., 2020). U oba slučaja, u tkivima školjkaša pronađene su bakterije iz koljena Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes i Planctomycetes. Međutim, kod nadzemne vrste *D. polymorpha* nađeno je fotoautotrofno koljeno Cyanobacteria koje nije bilo prisutno u školjkašima roda *Congeria*, ali su zato bila prisutna koljena Chloroflexi i Nitrospirae koja kod površinske vrste nisu zabilježena. Oba koljena su ranije utvrđena kao sastavni dio mikrobnih obraštaja stijena i sedimenta u speleološkim objektima (Addesso i sur., 2021; Kostanjšek i sur., 2013; Pašić i sur., 2009; Pronk i sur., 2009; Yun i sur., 2016). Sekvence koje pripadaju ovim koljenima pronađene su u tkivima školjkaša i cjevaša te na ljušturama školjkaša, no ne i u uzorcima vode što upućuje na to da su vezane za organizme i sediment. Mnogi pripadnici bakterijskih koljena Chloroflexi i Nitrospirae su kemolitoautotrofi, odnosno koriste anorganske izvore ugljika i elektrona za dobivanje energije te se u podzemnim ekosustavima smatraju temeljima hranidbene mreže naspram fotosintetskih organizama u većini ostalih ekosustava. To znači da u vrlo konstantnim i oligotrofnim uvjetima u podzemlju, takav tip mikroba svojim metabolizmom može drugim špiljskim organizmima, odnosno ekosustavu ponuditi hranjive tvari koje su inače slabo dostupne čime čine iznimno važnu kariku u preoblikovanju mineralnog okoliša (Barton, 2006).

Zaključno, ovaj rad donosi prve podatke o mikrobnim zajednicama sesilnih filtratora dinarskog krškog podzemlja i kao takav predstavlja temelj za daljnja istraživanja. Primjerice, u budućim bi se istraživanjima moglo analizirati što sve utječe na sastav mikrobnih zajednica ovih organizama, poput okolišnih uvjeta, zdravstvenog i kondicijskog stanja i/ili genotipa domaćina. Osim toga, može se pretpostaviti da su mikrobi, uz pritok hranjivih tvari s površine, temelj hranidbenih mreža u podzemlju. Međutim, njihove točne uloge u hranidbenim mrežama zasad ostaju nepoznate.

6 Zaključak

U ovom radu su po prvi puta opisane mikrobne zajednice sesilnih stigobionata roda *Congeria*, vrste *M. cavatica* i vode u kojoj žive. Glavni zaključci ovog istraživanja su:

- iako su u svim tipovima uzoraka prevladavale bakterije iz koljena Proteobacteria, utvrđene su značajne razlike u sastavu i abundanciji mikrobnih zajednica svih analiziranih tipova uzoraka (tkiva i obrisaka školjkaša, tkiva cjevaša i vode),
- mikrobne zajednice tkiva cjevaša su se međusobno značajno razlikovale ovisno o lokaciji uzrokovanja, što bi moglo biti uzrokovano lokalnim uvjetima okoliša i/ili dugom izolacijom populacija,
- mikrobne zajednice tkiva školjkaša nisu se statistički značajno razlikovale ni ovisno o vrsti ni ovisno o sezoni/lokaciji uzorkovanja, što bi moglo biti uzrokovano malim uzorkom.

7 Literatura

Addesso, R., Gonzalez-Pimentel, J. L., D'Angeli, I. M., De Waele, J., Saiz-Jimenez, C., Jurado, V., Miller, A. Z., Cubero, B., Vigliotta, G. i Baldantoni, D. (2021). Microbial Community Characterizing Vermiculations from Karst Caves and Its Role in Their Formation. *Microbial Ecology*, *81*(4), 884–896.

Andersen, T., Baranov, V., Hagenlund, L. K., Ivković, M., Kvifte, G. M. i Pavlek, M. (2016). Blind Flight? A new troglobiotic orthoclad (Diptera, Chironomidae) from the Lukina Jama-Trojama cave in Croatia. *PLoS ONE*, *11*(4), e0152884.

Barton, H. A. (2006). Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*, *68*(2), 43–54.

Bilandžija, H., Bedek, J., Jalžić, B. i Gottstein, S. (2007). The morphological variability, distribution patterns and endangerment in the Ogulin cave sponge *Eunapius subterraneus* Sket i Velikonja, 1984 (Demospongiae, Spongillidae). *Natura Croatica*, *16*(1), 1–17.

Bilandžija, H., Čuković, T. i Puljas, S. (2014). *Protokol praćenja stanja vrsta Congeria kusceri Bole, 1962 i Congeria jalzici Morton & Bilandžija, 2013 u Republici Hrvatskoj*.

Bilandžija, H., Morton, B., Podnar, M., Ćetković, H., Cetković, H. i Ćetković, H. (2013). Evolutionary history of relict *Congeria* (Bivalvia: Dreissenidae): unearthing the subterranean biodiversity of the Dinaric Karst. *Frontiers in zoology*, *10*(1), 5.

Biondić, B. i Biondić, R. (2014). *Hidrogeologija dinarskog krša u Hrvatskoj*. Geotehnički fakultet, Varaždin.

Bokulich, N. A., Kaehler, B. D., Rideout, J. R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G. A. i Caporaso, J. G. (2018). Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome*, *6*(1), 90.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., … Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, *37*(8), 852–857.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A. i Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, *13*(7), 581.

Cheung, M. K., Yip, H. Y., Nong, W., Law, P. T. W., Chu, K. H., Kwan, H. S. i Hui, J. H. L. (2015). Rapid Change of Microbiota Diversity in the Gut but Not the Hepatopancreas During Gonadal Development of the New Shrimp Model *Neocaridina denticulata*. *Marine Biotechnology*, 17(6), 811–819.

Culver, D. C. i Sket, B. (2000). Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies*, *62*(1), 11–17.

Daims, H. (2014). The Family Nitrospiraceae. U: Rosenberg, E., DeLong, E., Lory, S., Stackebrandt, E. i Thompson, F. (ur.) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, str. 733–749.

Daims, H., Lebedeva, E. V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R. H., Von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P. H. i Wagner, M. (2015). Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature*, 528(7583), 504–509.

Dattagupta, S., Schaperdoth, I., Montanari, A., Mariani, S., Kita, N., Valley, J. W. i MacAlady, J. L. (2009). A novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *ISME Journal*, *3*(8), 935–943.

Dragičević, P., Bielen, A., Petrić, I., Vuk, M., Žučko, J. i Hudina, S. (2021). Microbiome of the Successful Freshwater Invader, the Signal Crayfish, and Its Changes along the Invasion Range. *Microbiology Spectrum*, 9(2).

Ford, D. i Williams, P. (2007). *Karst Hydrogeology and Geomorphology*. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.

Gaston, K. H. i David, R. (1994). Hotspots across Europe. *Biodiversity Letters*, *2*(4), 108–116.

Gerič, B., Pipan, T. i Mulec, J. (2004). Diversity of culturable bacteria and meiofauna in the epikarst of Škocjanske jame Caves (Slovenia). *Acta Carsologica*, 301–310.

Givens, C. E., Burnett, K. G., Burnett, L. E. i Hollibaugh, J. T. (2013). Microbial communities of the carapace, gut, and hemolymph of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Marine Biology*, 160(11), 2841–2851.

Gottstein Matočec, S., Bakran-Petricioli, T., Bedek, J., Bukovec, D., Buzjak, S., Franičević, M., Jalžić, B., Kerovec, M., Kletečki, E., Kralj, J., Kružić, P., Kučinić, M., Kuhta, M., Matočec, N., Ozimec, R., Rada, T., Štamol, V., Ternjej, I. i Tvrtković, N. (2002). An overview of the cave and interstitial biota of Croatia. *Natura Croatica, 11*(SUPP), 1–102.

Gottstein, S. (2010). *Priručnik za određivanje podzemnih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima EU*. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Jovanović Glavaš, O., Jalžić, B. i Bilandžija, H. (2017). Population density, habitat dynamic and aerial survival of relict cave bivalves from genus *Congeria* in the Dinaric karst. *International Journal of Speleology, 46*(1), 13–22.

Katoh, K. i Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution, 30*(4), 772–780.

Kellenberger, E. (2001). Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO reports, 2*(1), 5–7.

Kostanjšek, R., Pašić, L., Daims, H. i Sket, B. (2013). Structure and Community Composition of Sprout-Like Bacterial Aggregates in a Dinaric Karst Subterranean Stream. *Microbial Ecology, 66*(1), 5–18.

Kostanjšek, R., Prodan, Y., Stres, B. i Trontelj, P. (2019). Composition of the cutaneous bacterial community of a cave amphibian, *Proteus anguinus*. *FEMS Microbiology Ecology, 95*(3), 1–7.

Kraková, L., Šoltys, K., Budiš, J., Grivalský, T., Ďuriš, F., Pangallo, D. i Szemes, T. (2016). Investigation of bacterial and archaeal communities: novel protocols using modern sequencing by Illumina MiSeq and traditional DGGE-cloning. *Extremophiles, 20*(5), 795–808.

Kupriyanova, E. K., Ten Hove, H. A., Sket, B., Zakšek, V., Trontelj, P. i Rouse, G. W. (2009). Evolution of the unique freshwater cave-dwelling tube worm *Marifugia cavatica* (Annelida: Serpulidae). *Systematics and Biodiversity, 7*(4), 389–401.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. i Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments, 62*, 1–5.

L Lee, Y., Park, J., Rhee, O. i Lee, G. (2014). Identification of waterborne microbial pathogens by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and the biotyper 2.0 databases. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(5), 3525-3530.

Ley, R. E., Harris, J. K., Wilcox, J., Spear, J. R., Miller, S. R., Bebout, B. M., ... Pace, N. R. (2006). Unexpected diversity and complexity of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3685-3695.

Lokmer, A. i Mathias Wegner, K. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME Journal*, 9(3), 670–682.

Mathai, P. P., Magnone, P., Dunn, H. M. i Sadowsky, M. J. (2020). Water and sediment act as reservoirs for microbial taxa associated with invasive dreissenid mussels. *Science of the Total Environment*, *703*(134915).

McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., Desantis, T. Z., Probst, A., Andersen, G. L., Knight, R. i Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME Journal*, *6*(3), 610–618.

Mihevc, A., Prelovšek, M. i Hajna, N. Z. (2010). *Introduction to the Dinaric karst*. Inštitut za raziskovanje krasa ZRC SAZU, Postojna.

Moldovan, O. T., L'ubomír Kováč i Halse, S. (ur.) (2018). *Cave Ecology*. Springer, Cham.

Mulec, J. (2008). Microorganisms in hypogeon: Examples from Slovenian karst caves. *Acta Carsologica*, *37*(1), 153–160.

Mulec, J., Oarga-Mulec, A., Tomazin, R. i Matos, T. (2015). Characterization and fluorescence of yellow biofilms in karst caves, southwest Slovenia. *International Journal of Speleology*, *44*(2), 107–114.

Narodne novine NN 124/13 i 105/15 (2015). Uredba o ekološkoj mreži Republike Hrvatske.

Narodne novine NN 144/13 i 73/16 (2016). Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama.

Narodne novine NN 80/13 i 15/18 (2018). Zakon o zaštiti prirode.

Ooi, M. C., Goulden, E. F., Smith, G. G. i Bridle, A. R. (2019). Haemolymph microbiome of the cultured spiny lobster *Panulirus ornatus* at different temperatures. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13.

Ozimec, R., Bedek, J., Gottstein, S., Jalžić, B., Rajko Slapnik, R., Štamol, V., Bilandžija, H., Dražina, T., Kletečki, E., Komerički, A., Lukić, M. i Pavlek, M. (2009). *Crvena knjiga špiljske faune Hrvatske*. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.

Pašić, L., Kovče, B., Sket, B. i Herzog-Velikonja, B. (2009). Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology*, *71*(1), 50–60.

Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., Cournapeau, D., Brucher, M., Perrot, M. i Duchesnay, É. (2011). Scikit-learn: Machine learning in Python. *Journal of machine learning research*, *12*, 2825–2830.

Price, M. N., Dehal, P. S. i Arkin, A. P. (2010). FastTree 2–approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS ONE*, *5*(3), e9490.

Pronk, M., Goldscheider, N. i Zopfi, J. (2009). Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. *Hydrogeology Journal*, *17*(1), 37–48.

Retter, A., Karwautz, C. i Griebler, C. (2021). Groundwater microbial communities in times of climate change. *Current Issues in Molecular Biology*, 41, 509–538.

Sket, B. (1999). The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and Conservation*, *8*(10), 1319–1338.

Shui, Y., Guan, Z. B., Liu, G. F. i Fan, L. M. (2020). Gut microbiota of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in integrated crayfish-rice cultivation model. *AMB Express*, 10(1).

Velikonja, B. H., Tkavc, R. i Pašić, L. (2014). Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of macroscopic microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia. *International Journal of Speleology*, *43*(1), 45–56.

Vijayan, N., Lema, K. A., Nedved, B. T. i Hadfield, M. G. (2019). Microbiomes of the polychaete *Hydroides elegans* (Polychaeta: Serpulidae) across its life-history stages. *Marine Biology*, *166*(2), 1–13.

Vörös, J., Márton, O., Schmidt, B. R., Gál, J. T. i Jelić, D. (2017). Surveying Europe's Only Cave-Dwelling Chordate Species (*Proteus anguinus*) Using Environmental DNA. *PLOS ONE*, *12*(1), e0170945.

Vuk, M. (2017). *Bioraznolikost i antibiotička rezistencija bakterijskih izolata Dinarskog krškog podzemlja*. Rad za Rektorovu nagradu, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Zagreb.

Wilkens, H., Culver, D. C. i Humphreys, W. F. (ur.) (2001). *Subterranean ecosystems*. Elsevier, Amsterdam.

Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y. i Engel, A. S. (2016). The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1955.

8 Životopis

Upisala sam preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku 2015. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sam u tri navrata aktivno sudjelovala u manifestaciji *Noć biologije* od kojih sam dva puta bila koordinator studentske grupe. Laboratorijsku stručnu praksu sam započela 2016. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu za čije sam vrijeme izradila rad *Bioraznolikost i antibiotička rezistencija bakterijskih izolata Dinarskog krškog podzemlja*. Rad je 2017. nagrađen Rektorovom nagradom kao individualni znanstveni rad u području prirodnih znanosti. Nakon toga sam provela semestar kao demonstrator na kolegiju Osnove biologije te sam se učlanila u Udrugu studenata biologije – BIUS. Tamo sam vodila mikrobiološku sekciju godinu dana i u tom periodu sam organizirala rad sekcije na istraživačko-edukacijskom projektu *Šuma Žutica 2018.* i sudjelovala kao volonter i koordinator na projektu *U društvu mikroba* sufinanciranom iz Europskog socijalnog fonda. Preddiplomski studij sam završila 2019. godine završim radom naziva *Putevi unosa i širenja invazivnih stranih vrsta*. Istu godinu i početak iduće (2020.) sam provela kao studentski pripravnik u tvrtki Oikon d.o.o. – Institut za primijenjenu ekologiju. Kao članica stručnog tima sam sudjelovala na projektima u nastavku.

- Analize putova unošenja i širenja invazivnih stranih vrsta u sklopu projekta „Uspostava nacionalnog sustava za praćenje invazivnih vrsta“ (naručitelj: Hrvatska agencija za okoliš i prirodu)
- Izrada idejnog rješenja i Studije utjecaja zahvata na okoliš za obilaznicu Ogulina, duljine 11,00 km (naručitelj: Hrvatske ceste d.o.o.)
- Izrada prijedloga stručne podloge za proglašenje regionalnog parka Ćićarija u sklopu projekta LIKE – *Living on the Karst Edge* (naručitelj: Istarska županija)
- Programi monitoringa za vjetroelektranu Lukovac, Općina Cista Provo (naručitelj: Vjetroelektrana Lukovac d.o.o.)
- Provođenje jednogodišnjeg istraživanja ornitofaune, velikih zvijeri i šišmiša te izrada elaborata o prihvatljivosti planiranog zahvata u području prirode za potrebe procjene utjecaja na okoliš, Grupa 1: Provođenje jednogodišnjeg istraživanja velikih zvijeri te izrada elaborata (naručitelj: HEP Proizvodnja d.o.o.)

Dio sam jednog objavljenog znanstvenog rada te sam prezentirala jedan poster s domaćom i jedan s međunarodnom recenzijom. Također sam imala jedno usmeno izlaganje s domaćom i jedno s međunarodnom recenzijom. Reference se nalaze u nastavku.

- Dragičević, P., Bielen, A., Petrić, I., Vuk, M., Žučko, J., Hudina, S. (2021). Microbiome of the Successful Freshwater Invader, the Signal Crayfish, and Its Changes along the Invasion Range. *Microbiology spectrum*, 9(2), e00389-21.
- Vuk, M., Hudina, S., Kazazić, S., Lajtner, J., Puljas, S., Bielen, A. (2017a). Diversity of Biofilm Microbial Communities in the Subterranean Ecosystem: Markov ponor, Lipovo polje. *2nd Symposium on Freshwater Biology*, Croatian Association of Freshwater Ecologists, Zagreb. (poster, domaća recenzija)
- Vuk, M., Hudina, S., Kazazić, S., Šimatović, A., Lajtner, J., Udiković Kolić, N., Bielen, A. (2017b). Raznolikost i otpornost na antibiotike bakterijskih izolata Dinarskog krškog podzemlja. *Treći simpozij studenata bioloških usmjerenja*, Udruga studenata biologije – BIUS, Zagreb. (usmeno izlaganje, domaća recenzija)
- Vuk, M., Orlić, K., Burić, L., Maguire, I., Makkonen, J., Vladušić, T., Šver, L., Hrašćan, R., Hudina, S., Bielen, A. (2019a). Cuticle-associated microbial communities of freshwater crayfish Astacus leptodactylus are affected by water temperature and the presence of pathogen Aphanomyces astaci. *11th Symposium for European Freshwater Sciences*, Croatian Association of Freshwater Ecologists, Zagreb. (poster, međunarodna recenzija)
- Vuk, M., Pavić, V., Lugić, E., Birov, T., Sviben, S. (2019b). Methodology of analysis of introduction pathways and spread of invasive alien species – an overview. *4th Regional Conference on Environmental Impact Assessment*, Croatian Association of Experts in Nature and Environmental Protection, Zagreb. (usmeno izlaganje, međunarodna recenzija)

9 Prilozi

Prilog 1. Matrica značajnosti netežinske UniFrac metode svih uzoraka u radu, statistički značajne vrijednosti su obojane crveno.

netežinski UniFrac (p-vrijednost)	Cj18 (n=3)	Ck19 (n=2)	Cm19 (n=3)	obr_Cj18 (n=2)	obr_Cj20 (n=1)	obr_Ck19 (n=2)	obr_Ck20 (n=2)	obr_Cm18 (n=3)	obr_Cm19 (n=2)	Mc_Cj20 (n=4)	Mc_Ck20 (n=4)	vod_Cj18 (n=6)	vod_Cm18 (n=3)	vod_Cm19 (n=4)	vod_Mc_Cj20 (n=4)	vod_Mc_Ck20 (n=2)
Cj18 (n=3)		0,086	0,109	0,203	0,263	0,093	0,103	0,103	0,116	**0,024**	**0,029**	**0,014**	0,094	**0,015**	**0,023**	0,105
Ck19 (n=2)	0,086		0,090	0,326	0,338	0,354	0,324	0,097	0,365	0,057	0,056	**0,039**	0,095	0,067	0,056	0,336
Cm19 (n=3)	0,109	0,090		0,101	0,270	0,105	0,112	0,111	0,105	**0,023**	**0,032**	**0,015**	0,088	**0,020**	**0,032**	0,108
obr_Cj18 (n=2)	0,203	0,326	0,101		0,680	0,287	0,336	0,097	0,348	0,069	0,061	**0,043**	0,104	0,066	0,071	0,349
obr_Cj20 (n=1)	0,263	0,338	0,270	0,680		0,342	0,327	0,255	0,316	0,228	0,214	0,129	0,256	0,195	0,220	0,343
obr_Ck19 (n=2)	0,093	0,354	0,105	0,287	0,342		0,324	0,101	0,343	0,068	0,066	**0,036**	0,092	0,068	0,075	0,349
obr_Ck20 (n=2)	0,103	0,324	0,112	0,336	0,327	0,324		0,113	0,343	0,059	0,068	**0,041**	0,092	0,065	0,076	0,319
obr_Cm18 (n=3)	0,103	0,097	0,111	0,097	0,255	0,101	0,113		0,326	**0,025**	**0,028**	**0,019**	0,106	**0,028**	**0,026**	0,100
obr_Cm19 (n=2)	0,116	0,365	0,105	0,348	0,316	0,343	0,343	0,326		0,079	0,069	**0,037**	0,100	0,069	0,077	0,345
Mc_Cj20 (n=4)	**0,024**	0,057	**0,023**	0,069	0,228	0,068	0,059	**0,025**	0,079		**0,023**	**0,006**	**0,037**	**0,030**	**0,021**	0,059
Mc_Ck20 (n=4)	**0,029**	0,056	**0,032**	0,061	0,214	0,066	0,068	**0,028**	0,069	**0,023**		**0,010**	**0,030**	**0,020**	**0,024**	0,061
vod_Cj18 (n=6)	**0,014**	**0,039**	**0,015**	**0,043**	0,129	**0,036**	**0,041**	**0,019**	**0,037**	**0,006**	**0,010**		**0,009**	**0,001**	**0,006**	**0,034**
vod_Cm18 (n=3)	0,094	0,095	0,088	0,104	0,256	0,092	0,092	0,106	0,100	**0,037**	**0,030**	**0,009**		**0,030**	**0,026**	0,111
vod_Cm19 (n=4)	**0,015**	0,067	**0,020**	0,066	0,195	0,068	0,065	**0,028**	0,069	**0,030**	**0,020**	**0,001**	**0,030**		**0,033**	0,126
vod_Mc_Cj20 (n=4)	**0,023**	0,056	**0,032**	0,071	0,220	0,075	0,076	**0,026**	0,077	**0,021**	**0,024**	**0,006**	**0,026**	**0,033**		0,056
vod_Mc_Ck20 (n=2)	0,105	0,336	0,108	0,349	0,343	0,349	0,319	0,100	0,345	0,059	0,061	**0,034**	0,111	0,126	0,056	

Prilog 2. Matrica značajnosti težinske UniFrac metode svih uzoraka u radu, statistički značajne vrijednosti su obojane crveno.

težinski UniFrac (p-vrijednost)	**Cj18 (n=3)**	**Ck19 (n=2)**	**Cm19 (n=3)**	**obr_Cj18 (n=2)**	**obr_Cj20 (n=1)**	**obr_Ck19 (n=2)**	**obr_Ck20 (n=2)**	**obr_Cm18 (n=3)**	**obr_Cm19 (n=2)**	**Mc_Cj20 (n=4)**	**Mc_Ck20 (n=4)**	**vod_Cj18 (n=6)**	**vod_Cm18 (n=3)**	**vod_Cm19 (n=4)**	**vod_Mc_Cj20 (n=4)**	**vod_Mc_Ck20 (n=2)**
Cj18 (n=3)		0,089	0,110	0,193	0,253	0,100	0,106	0,097	0,107	**0,024**	**0,028**	**0,011**	0,106	**0,031**	**0,031**	0,089
Ck19 (n=2)	0,089		0,100	0,310	0,345	0,330	0,333	0,118	0,324	0,072	0,076	**0,043**	0,098	0,056	0,078	0,319
Cm19 (n=3)	0,110	0,100		0,113	0,251	0,115	0,098	0,112	0,094	**0,027**	**0,040**	**0,010**	0,121	**0,032**	**0,031**	0,111
obr_Cj18 (n=2)	0,193	0,310	0,113		0,331	0,336	0,333	0,093	0,327	0,055	0,057	**0,038**	0,094	0,079	0,077	0,333
obr_Cj20 (n=1)	0,253	0,345	0,251	0,331		0,360	0,341	0,505	0,359	0,184	0,201	0,139	0,258	0,172	0,202	0,323
obr_Ck19 (n=2)	0,100	0,330	0,115	0,336	0,360		0,324	0,093	0,346	0,068	0,067	**0,030**	0,091	0,079	0,066	0,353
obr_Ck20 (n=2)	0,106	0,333	0,098	0,333	0,341	0,324		0,101	0,340	0,065	0,073	**0,030**	0,084	0,064	0,059	0,343
obr_Cm18 (n=3)	0,097	0,118	0,112	0,093	0,505	0,093	0,101		0,112	**0,032**	**0,042**	**0,014**	0,101	**0,026**	**0,028**	0,098
obr_Cm19 (n=2)	0,107	0,324	0,094	0,327	0,359	0,346	0,340	0,112		0,059	0,082	**0,035**	0,082	0,065	0,072	0,338
Mc_Cj20 (n=4)	**0,024**	0,072	**0,027**	0,055	0,184	0,068	0,065	**0,032**	0,059		**0,023**	**0,006**	**0,026**	**0,017**	**0,026**	0,056
Mc_Ck20 (n=4)	**0,028**	0,076	**0,040**	0,057	0,201	0,067	0,073	**0,042**	0,082	**0,023**		**0,008**	**0,031**	**0,024**	**0,030**	0,076
vod_Cj18 (n=6)	**0,011**	**0,043**	**0,010**	**0,038**	0,139	**0,030**	**0,030**	**0,014**	**0,035**	**0,006**	**0,008**		**0,010**	**0,004**	**0,008**	**0,044**
vod_Cm18 (n=3)	0,106	0,098	0,121	0,094	0,258	0,091	0,084	0,101	0,082	**0,026**	**0,031**	**0,010**		**0,030**	**0,028**	0,087
vod_Cm19 (n=4)	**0,031**	0,056	**0,032**	0,079	0,172	0,079	0,064	**0,026**	0,065	**0,017**	**0,024**	**0,004**	**0,030**		**0,032**	0,051
vod_Mc_Cj20 (n=4)	**0,031**	0,078	**0,031**	0,077	0,202	0,066	0,059	**0,028**	0,072	**0,026**	**0,030**	**0,008**	**0,028**	**0,032**		0,060
vod_Mc_Ck20 (n=2)	0,089	0,319	0,111	0,333	0,323	0,353	0,343	0,098	0,338	0,056	0,076	**0,044**	0,087	0,051	0,060	