

Analize DNA iz okoliša

Pischiutta, Nikola

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:214268>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nikola Pischiutta

Analize DNA iz okoliša

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Nikola Pischitta

Environmental DNA analyses

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa preddiplomskog studija molekularne biologije na Zoologijskom zavodu biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Damjana Franjevića.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Analize DNA iz okoliša

Nikola Pischiutta

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Okolišna DNA je svaki genetički materijal koji organizam ispusti u okoliš, a da više nije dio tog organizma. Takva DNA može određeno vrijeme opstati u okolišu iz kojeg se može uzorkovati i analizirati. Analize DNA iz okoliša uključuju tri glavna koraka: uzorkovanje, laboratorijski rad i bioinformatička obrada. Metoda uzorkovanja odabire se ovisno o tipu okoliša i supstrata. Nakon uzorkovanja i izolacije DNA prema standardnim protokolima, DNA se umnaža pomoću metode lančane reakcije polimerazom (PCR). Kod umnažanja DNA odabiru se odgovarajuće regije DNA u genomu koje će se umnožiti jer o tome ovisi mogućnost međusobnog razlikovanja vrsta. Sekvenciranjem dobivenih PCR produkata dobivaju se sljedovi nukleotida koji se obrađuju bioinformatičkim alatima i uspoređuju s podacima u referentnim bazama podataka čime se utvrđuje koje su vrste bile prisutne u uzorku. Metoda identifikacije vrsta prema slijedu nukleotida naziva se metabarkodiranje. Pomoću ovih metoda moguće je utvrditi sastav vrsta flore i faune na određenom tipu staništa, istražiti međusobne interakcije između organizama i analizirati ekosustave iz prošlosti. Danas analize DNA iz okoliša, zbog jednostavnosti i učinkovitosti pristupa, nalaze sve veću primjenu u područjima ekologije, konzervacijske i evolucijske biologije, paleontologije i biomonitoringa.

Ključne riječi: PCR, sekvenciranje, metabarkodiranje, biomonitoring, ekosustavi
(17 stranica, 0 slika, 0 tablica, 36 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Damjan Franjević

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Environmental DNA analyses

Nikola Pischiutta

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Environmental DNA is any genetic material that a living being releases into the environment, but is no longer a part of that organism. Such DNA can persist for a certain amount of time in the environment from which it can be sampled and analyzed. Environmental DNA analyses involve three main steps: sampling, laboratory work, and bioinformatic processing. After following standard protocols for environmental DNA sampling and isolation, the DNA is amplified using the polymerase chain reaction (PCR). Before DNA amplification, the appropriate genomic region is selected to be amplified, as the possibility of differentiating species depends on it. By sequencing the PCR products, nucleotide sequences are obtained, which are processed using bioinformatic tools and compared with existing data in reference databases. This method determines which species were initially present in the sample and is called metabarcoding. Using these methods, it is possible to determine the composition of species of flora and fauna in a certain type of habitat, to investigate mutual interactions between organisms and to analyze ancient ecosystems. Due to the simplicity and efficiency of the approach, environmental DNA analyses are increasingly used in the fields of ecology, conservation and evolutionary biology, paleontology and biomonitoring.

Keywords: PCR, sequencing, metabarcoding, biomonitoring, ecosystems
(17 pages, 0 figures, 0 tables, 36 references, original in: croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Damjan Franjević

POPIS KRATICA

aDNA – drevna deoksiribonukleinska kiselina, engl. *ancient DNA*

BOLD – *Barcode of Life Data System*

COI – gen za citokrom c oksidazu I

Cytb – gen za citokrom b

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dPCR – digitalna lančana reakcija polimerazom

eDNA – okolišna deoksiribonukleinska kiselina, engl. *environmental DNA*

HTS – *high throughput sequencing*

ITS – unutarinja transkribirana razmaknica, engl. *internal transcribed spacer*

matK – gen za maturazu K

MOTU – *molecular operational taxonomic unit*

mtDNA – mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina

NGS – *next generation sequencing*

pb – parovi baza

PCR – lančana reakcija polimerazom, engl. *Polymerase Chain Reaction*

qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimerazom

rbcL – gen za ribulozu 1,5-bisfosfat karboksilazu

RNA – ribonukleinska kiselina

rRNA – ribosomska ribonukleinska kiselina

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. METODE UZORKOVANJA DNA IZ OKOLIŠA.....	2
2.1. Tlo i sediment.....	2
2.2. Vodeni okoliš.....	3
2.3. Zrak.....	4
2.4. Ostali tipovi uzoraka.....	4
2.5. Reproducibilnost i ostali problemi uzorkovanja.....	4
3. LABORATORIJSKI RAD.....	5
3.1. Izolacija eDNA.....	5
3.2. Lančana reakcija polimerazom.....	6
3.3. Sekvenciranje.....	8
4. BIOINFORMATIČKE METODE.....	9
5. PRIMJENE ANALIZA DNA IZ OKOLIŠA.....	10
5.1. Ekologija.....	10
5.2. Konzervacijska biologija.....	10
5.3. Invazivne vrste i biomonitoring.....	11
5.4. Moguće primjene analiza DNA iz okoliša na području Hrvatske.....	11
6. PREDNOSTI, NEDOSTATCI I IZAZOVI.....	12
7. ZAKLJUČAK.....	13
8. LITERATURA.....	14

1. UVOD

U današnje vrijeme, uslijed sve većeg zagađenja okoliša, uočava se negativan trend izumiranja vrsta i smanjenja bioraznolikosti te se javlja sve veća potreba za biomonitoringom, odnosno nadziranjem populacija i broja vrsta svih organizama na nekom staništu (Deiner i sur. 2017). Međutim, da bi biomonitoring bio uspješno proveden, potreban je intenzivan terenski rad i dostupnost taksonomskih stručnjaka za pojedine skupine organizama. Kod takvog pristupa problem je neizbježno velik broj stručnjaka za taksonomiju i osoblja općenito, a problem predstavlja i potreba za prikupljanjem cjelovitih jedinki životinja čime se dodatno može ugroziti njihova brojnost. Zbog navedenih problema, razvijene su metode analize DNA iz okoliša pomoću kojih je moguće analizirati komponente ekosustava na mnogo učinkovitiji i manje invazivan način (Thomsen i Willerslev 2015).

DNA iz okoliša podrazumijeva bilo koji genetički materijal prikupljen izravno iz okolišnih uzoraka, kao što su voda, tlo, sediment ili zrak, bez prisutnosti izvornog biološkog materijala, odnosno organizama ili dijelova organizama iz kojih ona potječe. Viši organizmi najčešće ispuštaju DNA u okoliš u obliku odbačenih stanica i tkiva kao što su dlake i koža, putem izlučevina poput urina i izmeta ili kroz raspad mrtvih organizama. Ispuštena DNA neko vrijeme opstaje u okolišu gdje se može prikupiti i analizirati (Thomsen i Willerslev 2015). Proces analize DNA iz okoliša sastoji se od 3 veće komponente: terenski rad, laboratorijska obrada uzoraka i bioinformatička analiza. Rezultati nakon cijelog procesa dobivaju se kao sekvencije određenih sljedova DNA kojima se zatim može odrediti kojim vrstama pripadaju prema podacima dostupnima u referentnim bazama podataka.

Ovakav pristup istraživanju bioraznolikosti omogućava relativno brz i jednostavan način procjene broja vrsta u flori i fauni nekog staništa te, uz odgovarajuće modifikacije i optimizacije metoda, analize DNA iz okoliša mogu biti važan alat u ekologiji, konzervacijskoj biologiji, paleontologiji i biomonitoringu (Deiner i sur. 2017).

U ovom završnom radu bit će opisani načini prikupljanja uzoraka, najvažnije laboratorijske i bioinformatičke metode, prednosti i problemi navedenih metoda te moguće primjene analiza DNA iz okoliša u raznim granama biologije.

2. METODE UZORKOVANJA DNA IZ OKOLIŠA

Okolišna DNA (eDNA) nalazi se u raznim vrstama supstrata kao što su tlo, sediment, kopnene i morske vode, permafrost i zrak te za svaki od navedenih supstrata postoji zasebna metoda uzorkovanja te kasnija obrada sakupljenih uzoraka. Također, supstrat iz kojeg će se prikupljati uzorci ovisi o vrsti i području istraživanja. Zbog okolišnih uvjeta (temperatura, pH, salinitet, prisutnost kisika, ultraljubičasto zračenje) i prisutnosti mikroorganizama i enzima u okolišu, eDNA se, prije ili kasnije, degradira. U različitim tipovima okoliša eDNA ima različit stupanj degradacije, pa je tako degradacija u vodenim okolišima mnogo brža nego u tlu ili sedimentima. Okolišna DNA u vodenim okolišima opstaje od nekoliko sati do nekoliko dana (Barnes i sur. 2014) dok u tlu i sedimentima može opstati godinama prije nego se degradira do nemogućnosti bilo kakvih analiza (Thomsen i Willerslev 2015).

2.1. Tlo i sediment

Okolišna DNA iz uzoraka površinskog tla koristi se za analizu sastava i bioraznolikosti zajednica biljaka, gljiva, podzemnih kolutičavaca, beskralježnjaka i kralježnjaka (Deiner i sur. 2017). Iako nema standardnog protokola za uzorkovanje tla, u većini istraživanja je kao jedna lokacija uzorkovanja odabran krug određenog promjera unutar kojeg se uzima nekoliko uzoraka tla s različitih dubina ovisno o dubini na kojoj se istraživani organizmi najčešće pojavljuju. Uzorkovanje se vrši najčešće pomoću raznih bušaća tla koji se nakon svakog uzorkovanja moraju oprati vodom i sterilizirati plamenom da ne bi došlo do međusobne kontaminacije različitih uzoraka. Homogenizirani uzorci tla se u laboratoriju mogu čuvati u otopini s 96 %-tnim etanolom ili u spremnicima u zamrzivaču na $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Echeverría-Beirute i sur. 2021).

Uzorci kopnenih i akvatičkih sedimenata koriste se za analize drevne DNA, (engl. *ancient DNA*, aDNA) iz koje se dobivaju informacije o ekosustavima i sastavu zajednica iz prošlosti. Najčešće se sakupljaju na većim dubinama pomoću većih alata i bušaća koji mogu doprijeti na dubine od više desetaka metara pri čemu se mora paziti da se uzorci iz različitih slojeva međusobno ne kontaminiraju.

2.2. Vodeni okoliš

U slatkovodnim ekosustavima uzorci se mogu prikupljati iz vodenog stupca pomoću filtriranja ili kao gornji sloj sedimenta u svrhu analize bioraznolikosti vodenih beskralježnjaka i kralježnjaka. Uočeno je da se broj vrsta riba utvrđen analizom eDNA iz uzoraka površinske vode bolje poklapa s rezultatima konvencionalnih metoda (sakupljanje cjelovitih jedinki i morfološka determinacija) nego broj vrsta utvrđen analizom eDNA iz gornjeg sloja sedimenta (Shaw i sur. 2016). U gornjim slojevima sedimenta eDNA se nakuplja tijekom dužeg vremenskog razdoblja te su potrebna daljnja istraživanja da se točno utvrdi starost eDNA (Deiner i sur. 2017). Kod prikupljanja uzoraka iz potoka ili rijeka treba imati na umu da rezultati analize eDNA daju uvid u bioraznolikost mnogo šireg područja nego uzorci iz jezera i voda stajaćica. Zbog strujanja vode u rijekama i potocima, eDNA može biti nošena na mnogo veće udaljenosti nego u jezerima (Deiner i sur. 2017). Osim eDNA u jezerima i rijekama, eDNA može se prikupljati iz podzemnih voda te se dosad koristila u analizama raznolikosti bakterija, gljiva i istraživanjima rasprostranjenosti vodozemca *Proteus anguinus*, čovječje ribice (Vörös i sur. 2017). Budući da su ekosustavi podzemnih voda slabije istraženi, analize okolišne DNA imaju potencijal rasvijetliti skrivenu bioraznolikost podzemnih sustava i istražiti njihovu povezanost s površinskim vodama.

Prikupljanje uzoraka morske vode predstavlja veći izazov od prikupljanja kopnenih voda jer zahtijeva puno veći volumen uzorka zbog veće razrijeđenosti eDNA u morima te zbog saliniteta i morskih struja koje ubrzavaju degradaciju eDNA. Bez obzira na navedene teškoće, iz eDNA iz morske vode mogu se i dalje prikupiti vrijedni podatci o bioraznolikosti morskih mikroorganizama, riba i morskih sisavaca. Prijenos eDNA morskim strujama unutar stupca vode nije detaljno istražen, no, kao i u jezerima, eDNA se nakuplja u sedimentu na dnu mora gdje može ostati očuvana dulje vrijeme (Deiner i sur. 2017). Morski sedimenti mogu se također uzorkovati te, iako takav način uzorkovanja zahtijeva posebnu opremu za bušenje i predstavlja veliki logistički izazov, eDNA iz tih uzoraka može dati uvid u bioraznolikost i sastav zajednica bentoskih organizama (Guardiola i sur. 2016).

2.3. Zrak

Analize eDNA iz zraka temelje se na ekstrakciji DNA koja se nalazi na česticama pijeska, prašine, peludi i ostalim česticama u zraku. eDNA iz zraka najčešće se prikuplja pomoću raznih filtera zraka ili pomoću ljepljivih vrpca. Analize eDNA iz zraka najprije su služile za analize peludi koja može izazvati alergijske reakcije (Kraaijeveld i sur. 2015) te za analize spora gljiva (Banchi i sur. 2015). Otkriveno je da se eDNA iz zraka može koristiti i za analize mikroorganizama u bolnicama te da pruža više informacija o gljivama, bakterijama, arhejama i virusima u zraku od dosadašnje korištenih metoda uzgoja u kulturama (Tong i sur. 2017). Najnovija istraživanja otkrivaju da se iz eDNA iz zraka mogu identificirati vrste ptica i sisavaca u zooškom vrtu (Lynggaard i sur. 2022) te predstavljaju osnovu za daljnja istraživanja i mogućnosti upotrebe eDNA iz zraka.

2.4. Ostali tipovi uzoraka

Ostali tipovi supstrata koji se koriste u istraživanjima temeljenima na analizama eDNA uključuju izmet, slinu, med, krvne obroke pijavica i komaraca, sadržaj želuca i paukove mreže. Ovakvi supstrati najčešće se koriste za analizu jedne određene vrste i njenu interakciju s drugim organizmima u okolišu. Na primjer, analizom eDNA iz meda otkriva se s kojim sve vrstama biljaka, životinja i patogenih pčele dolaze u interakciju. Ovakva istraživanja pružaju zanimljiv uvid u hranidbene navike pojedinih vrsta te interakcije među organizmima koje je nemoguće ili vrlo teško otkriti tradicionalnim metodama (Ruppert i sur. 2019).

2.5. Reproducibilnost i ostali problemi uzorkovanja

Česti problemi kod uzimanja uzoraka za analize eDNA je što nema standardnih protokola i pravila za uzimanje uzoraka tako da se u pitanje dovodi reprezentativnost i čistoća uzoraka te točna lokacija uzorkovanja ako nije jasno navedena u radu. Svi navedeni problemi mogu utjecati na reproducibilnost istraživanja te na značajnost i točnost iznesenih podataka u radu. U svojem radu, Dickie i sur. (2018) navode osnovne smjernice kojih bi se trebalo pridržavati za učinkovito i pravilno uzorkovanje. Navode da za reproducibilnost uzorkovanja treba navesti točnu lokaciju,

površinu područja na kojem se vrši uzorkovanje, broj, lokacije, dubinu i količinu prikupljenih uzoraka te specifično naglasiti koja područja nisu pogodna za uzorkovanje, odnosno točno definirati tip supstrata. Broj uzoraka trebao bi biti određen analizom statističke snage testa (engl. *power analysis*) za uzimanje najmanjeg broja uzoraka koji i dalje mogu davati statistički značajne rezultate. Time se osigurava statistička značajnost rezultata, a potencijalni troškovi zbog analize prevelikog broja uzoraka se eliminiraju. Bitno je i da se oprema za uzorkovanje pravilno sterilizira ili da se koristi oprema za jednokratnu upotrebu da ne bi došlo do kontaminacije uzoraka i, posljedično, netočnih rezultata. Budući da sterilizacija etanolom ne uklanja DNA učinkovito (Dickie i sur. 2018) predlaže se korištenje izbjeljivača (natrijev hipoklorit) ili sterilizacija plamenom, a predlaže se i uzimanje brisa s opreme koji služi kao negativna kontrola čistoće opreme. U radovima je također potrebno navesti temperaturu i uvjete čuvanja uzoraka jer mogu utjecati na DNA, a predlaže se da se uzorci smrznu ili ohlade što prije nakon uzorkovanja.

3. LABORATORIJSKI RAD

3.1. Izolacija eDNA

Za izolaciju eDNA iz prikupljenog uzorka postoji niz različitih metoda ovisno o supstratu iz kojeg se DNA ekstrahira. Najčešće korišteni su komercijalni kompleti (kit-ovi) za izolaciju DNA zbog jednostavnosti korištenja i relativno učinkovite ekstrakcije. Ove metode najčešće funkcioniraju na principu enzimske razgradnje staničnih komponenti uz enzim proteinazu K te, u kasnijim koracima izolacije, vezanje DNA na posebne kolone s kojih se uz pomoć posebnih elucijskih otopina najprije ispiru proteini, lipidi i ostale neželjene komponente otopine, a na kraju se s kolone ispire čista DNA (Starček 2021). U svom radu, Tsuji i sur. (2019) zaključuju da uspješnost izolacije DNA pomoću komercijalnih kompleta ovisi o načinu prikupljanja uzorka i tipu supstrata, odnosno prisutnosti i količini inhibitora enzimskih reakcija u supstratu te predlažu da se prije izolacije DNA treba pažljivo proučiti koji komplet bi bio najbolji s obzirom na vrstu uzorka. Osim komercijalnih kompleta, za izolaciju eDNA često se koriste i metode koje koriste organska otapala za izolaciju DNA (engl. *liquid phase separation method*) kojima se također može učinkovito ekstrahirati DNA. Najčešće korištene metode kod ovakvog načina izolacije su pomoću amfipatskog deterdženta CTAB (cetil trimetil amonij bromid) i otopine PCI (fenol - kloroform - izoamilni alkohol). Nedostatak metoda koje koriste organska otapala je što ona zahtijevaju posebnu

pažnju pri radu i odlaganju otpada jer koriste toksične kemikalije kao što su kloroform i fenol. Postoji niz istraživanja koja koriste modificirane protokole izolacije i uspoređuju ih s protokolima komercijalnih kompleta (Hunter i sur. 2019), a mnogi dobivaju uspješnije rezultate (veći prinos eDNA) od komercijalnih protokola tako da je ponekad poželjno koristiti modificirane protokole prilagođene specifičnim tipovima uzoraka.

3.2. Lančana reakcija polimerazom

Lančana reakcija polimerazom, odnosno PCR (Mullis i sur. 1986) neizostavna je metoda za umnažanje specifičnih fragmenata DNA. Reakcija PCR odvija se u ciklusima od kojih svaki sadrži 3 glavna koraka: denaturacija kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica na jednolančanu DNA te sinteza komplementarnih lanaca DNA pomoću enzima termostabilne DNA-polimeraze. Za uspješno umnažanje željenih fragmenata potrebno je odabrati odgovarajuće početnice. Početnice su kratke oligonukleotidne sekvencije komplementarne specifično određenom slijedu DNA i označavaju mjesto početka sinteze novog lanca te o njima ovisi koji dio genoma će se umnožiti u reakciji.

Vrsta odabranih početnica uvelike ovisi o tipu istraživanja koje se provodi, odnosno istražuje li se samo jedna vrsta ili se pomoću metabarkodiranja proučava više skupina odjednom. Istraživanja jedne vrste organizma najčešći je tip istraživanja eDNA (Tsuji i sur. 2019) kojim se omogućava praćenje i detekcija invazivnih, ugroženih i endemskih vrsta na nekom području. Takva istraživanja temelje se na umnažanju odabranog fragmenta DNA pomoću vrsno specifičnih početnica. Kod istraživanja koja primjenjuju metabarkodiranje koristi se velika količina početnica dizajniranih posebno za jednu skupinu organizama na temelju određenog biljega koji, u idealnom slučaju, omogućuje razlikovanje različitih vrsta unutar skupine.

Standardni DNA biljezi, tako zvani, DNA barkodovi su sekvencije DNA, obično dulje od 500 pb, na temelju kojih se učinkovito mogu razlikovati pojedine skupine organizama do razine vrste. Za životinje, najčešće korištena DNA barkod regija je mitohondrijski gen za podjedinicu citokrom c oksidaze I (*COI*) (Hebert i sur. 2003); plastidni geni za ribulozu 1,5-bisfosfat karboksilazu (*rbcL*) i maturazu K (*matK*) služe kao barkodovi za biljke (Hollingsworth 2011), a unutarnja transkribirana razmaknica (ITS) kao barkod za gljive (Nilsson i sur. 2009). Alternativni

biljezi koji se koriste u istraživanjima eDNA su mitohondrijski gen za citokrom b (*Cytb*), D-omča (nekodirajuća regija mtDNA) i mitohondrijski ribosomski geni za 12S i 16S podjedinice rRNA (Tsuji i sur. 2019). U istraživanjima eDNA često se koriste alternativni biljezi jer je ponekad zbog stupnja degradacije eDNA nemoguće umnožiti cjelovite standardne DNA barkod regije veće duljine (Deiner i sur. 2017).

Budući da je eDNA relativno kratke duljine zbog određenog stupnja degradacije, potrebno je osmisлити kratke DNA biljege dovoljno velike da razlikuju jednu vrstu od druge ili treba koristiti više različitih biljega u istraživanju (Ruppert i sur. 2019).

Različiti tipovi reakcije PCR i ostalih metoda koriste se za detekciju produkata i kontrolu uspješnosti reakcije, a najčešće korištene reakcije su standardni PCR te detekcija produkata pomoću gel elektroforeze, kvantitativni PCR (qPCR) i digitalni PCR (dPCR). Gel elektroforeza je metoda kojim se određuje prisutnost i duljina fragmenata DNA u uzorcima. Elektroforeza je metoda koristi prirodni negativan naboj molekule DNA za njezino pokretanje u električnom polju u kojem se DNA kreće prema pozitivno nabijenoj elektrodi. Vizualizacija DNA u elektroforetskom gelu omogućuje se fluorescentnim bojama koje se vežu za DNA. Standardni PCR i gel elektroforeza ne zahtijevaju skupe aparate i kemikalije, no precizna kvantifikacija količine DNA u elektroforetskom gelu nakon reakcije PCR nije moguća i elektroforeza služi samo da se potvrdi prisutnost zadovoljavajuće količine DNA u uzorcima što je za određena istraživanja dovoljno. Kvantitativni PCR omogućuje točnu kvantifikaciju DNA u uzorku, a ako se provodi qPCR baziran na DNA probi (engl. *probe-based qPCR*) umjesto boji (engl. *dye-based qPCR*) za detekciju DNA, moguće je točno odrediti količinu i potvrditi prisutnost specifičnog fragmenta DNA. Digitalni PCR, kao i qPCR, omogućuje točnu kvantifikaciju DNA u uzorku te predstavlja precizniju metodu od qPCR jer inhibitori reakcije ne utječu na rezultate dPCR kao kod qPCR. Iako je dPCR preciznija metoda, oprema koja je potrebna za provedbu ove metode je skupa tako da se qPCR i dalje najviše koristi (Tsuji i sur. 2019).

Nakon provedene reakcije PCR, a prije sekvenciranja, potrebno je pročistiti DNA što podrazumijeva uklanjanje zaostalih enzima, nukleotida, početnica i prekratkih PCR produkata iz reakcijske otopine. Reakcije pročišćavanja najčešće se rade po standardnim protokolima uz komercijalne komplete za pročišćavanje DNA.

3.3. Sekvenciranje

Pomoću sekvenciranja određuje se slijed nukleotida u molekuli DNA. Danas postoji niz načina i metoda sekvenciranja s različitim platformama i uređajima za sekvenciranje te opis svake metode nadmašuje opseg ovog rada, no za istraživanja okolišne DNA najčešće se koriste metode sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) pomoću kojih se može paralelno sekvencirati od nekoliko stotina tisuća do desetaka milijuna sljedova DNA. U usporedbi sa standardnim sekvenciranjem, tzv. Sangerovo sekvenciranje (Sanger i sur. 1977), kojim se pojedinačno mogu sekvencirati sljedovi DNA duljine do 1000 pb, za istraživanja eDNA pogodnije su metode sekvenciranja visoke protočnosti (HTS) jer uzorci eDNA često sadrže sljedove velikog broja vrsta i Sangerovo sekvenciranje bi u tim slučajevima bilo sporo i neučinkovito (Shokralla i sur. 2012).

Jedna od najčešće korištenih platformi za sekvenciranje visoke protočnosti je Illumina Genome Analyzer koja koristi princip sekvenciranja sintezom. Sekvenciranje sintezom temelji se na sintezi sekvence pomoću DNA-polimeraze koja dodaje reverzibilne terminacijske nukleotide za sve četiri baze označene drugim bojama na 3' kraj DNA. Nakon svakog dodanog nukleotida sinteza se zaustavlja i posebna kamera očitava fluorescencijski signal nukleotida. Fluorescentna oznaka i terminacijska skupina se miču s nukleotida i sinteza DNA-polimerazom se nastavlja te se ciklus ponavlja sve dok se cijeli slijed ne očita (Trupković 2018).

Danas postoje razni servisi i institucije koje nude različite usluge sekvenciranja od kojih je jedna od najpoznatijih Macrogen Inc. Ovakve vrste institucija omogućuju pouzdano, brzo i relativno jeftino sekvenciranje te mogu umanjiti troškove nabave skupih aparata za sekvenciranje i čine sekvenciranje široko dostupnim.

4. BIOINFORMATIČKE METODE

Bioinformatička obrada jedan je od najvažnijih dijelova u istraživanju eDNA te zahtijeva poseban oprez jer o pažljivoj interpretaciji rezultata ovisi cijelo istraživanje. Rezultati dobiveni sekvenciranjem najprije se moraju “urediti”, što znači da se moraju ukloniti sve sekvencije s lošom kvalitetom očitavanja ili prekratke sekvencije (kraće od 20 – 100 pb). Zatim se krajevi sekvencija, koji često znaju biti loše očitani u uređajima za sekvenciranje, također moraju ukloniti. Ako se radi o obostranom sekvenciranju (paired – end sequencing), sljedovi očitani u oba smjera (forward i reverse sljedovi) moraju se spojiti u cjelovitu sekvenciju na temelju međusobnog preklapanja u parovima baza u minimalnoj duljini od 20 pb (Deiner i sur. 2017).

Nakon obrade sekvenci, pomoću referentne baze podataka, sljedovi se svrstavaju u molekularne operacijske taksonomske jedinice (MOTU). Referentne baze podataka koje sadrže podatke o tome koja sekvencija određenog biljega pripada kojoj vrsti ili već postoje ili se moraju napraviti u istraživanju ako istraživanih vrsta nema u postojećim bazama podataka. Nove referentne baze podataka mogu se napraviti pomoću metode DNA barkodiranja tako da se vrste od interesa morfološki identificiraju te, nakon izolacije i sekvenciranja određene barkod regije njihove DNA, da se sekvenciranim sljedovima pridruži odgovarajuće ime vrste. Najpoznatija baza podataka u kojoj se nalaze sekvencije standardnih barkod regija (*COI*, *rbcL*, *matK*, *ITS*) je baza BOLD (*Barcode of Life Data System*) (Ratnasingham i Hebert 2007) koja sadrži i vlastiti sustav identifikacije vrste prema sekvenciji barkod regije. Od ostalih baza podataka važnija je i baza GenBank koju je uspostavio i održava NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) te koja pohranjuje sekvencije mnogih drugih gena (Benson i sur. 2012). Za potrebe analiza eDNA i metabarkodiranja često su potrebni robusniji programi koji mogu analizirati više sekvencija odjednom i odrediti taksonomsku skupinu uspoređujući sljedove s onima u bazama podataka. Postoji niz ovakvih programa koji koriste metode usporedbe sličnosti sekvenci pomoću poravnanja sljedova (BLAST) ili modela Markovljevog lanca (jMOTU), pomoću strojnog učenja, pomoću filogenetičkih analiza ili kombinacijom navedenih metoda svrstavaju sekvencije u odgovarajuću taksonomsku skupinu (Bazinet i Cummings 2012, Deiner i sur. 2017). Za najtočnije određivanje taksonomskih skupina predloženo je da se koristi više različitih metoda klasifikacije sekvenci (Deiner i sur. 2017).

5. PRIMJENE ANALIZA DNA IZ OKOLIŠA

5.1. Ekologija

Analize eDNA u području ekologije uvelike mogu pridonijeti znanjima o broju i bogatstvu vrsta u ekosustavu, međusobnim interakcija između organizama i hranidbenim mrežama. Iako se informacije o brojnosti vrsta na nekom području uvelike ne razlikuju od klasičnih metoda, prednost analiza eDNA, pogotovo metabarkodiranja, je što daju uvid u kompletan sastav vrsta kroz više taksonomskih skupina (biljke, životinje, gljive, bakterije) na nekom području u vrlo kratkom vremenu (Deiner i sur. 2017). Analizama eDNA iz sadržaja želudca i izmeta može se u kratkom vremenu može dobiti bolji uvid u prehrabene navike istraživanih vrsta. Ovakve vrste istraživanja mogu ukazati na raznolikost i specifičnosti prehrane koje bi konvencionalnim metodama bilo teško ili nemoguće detektirati. Najčešći tip ovakvih istraživanja su istraživanja odnosa plijena i predatora, prehrabnih preferenci biljojeda i odnosa biljaka i oprašivača (Banerjee i sur. 2022). Ova su istraživanja bitna jer mogu ukazati na dosad nepoznate odnose između organizama te potaknuti prikladnije mjere zaštite i očuvanja bioraznolikosti (Deiner i sur. 2017).

5.2. Konzervacijska biologija

Kroz praćenje i detekciju prisutnosti ugroženih vrsta putem analiza eDNA omogućen je jednostavniji nadzor ugroženih vrsta u zaštićenim područjima te se može pratiti prisutnost više vrsta istovremeno. Također, budući da analize DNA ne zahtijevaju invazivne metode uzorkovanja, kao što je već spomenuto, prikladne su za istraživanje ugroženih i osjetljivih vrsta. Problemi s analizama eDNA u svrhe nadziranja osjetljivih vrsta su što se pomoću eDNA ne može odrediti potječe li DNA od žive ili mrtve jedinke i ne može se odrediti starost niti brojnost jedinki (Deiner i sur. 2017).

Analize drevne DNA do danas predstavljaju jedinu metodu analize ekosustava iz prošlosti. Pomoću detaljnijih analiza aDNA može se razumjeti kako su vrste u prošlosti izumirale te se ta saznanja mogu primijeniti na današnje ekosustave da se bolje razumije nepredvidiva dinamika populacija i uloga čovjeka tim procesima (Thomsen i Willerslev 2015).

5.3. Invazivne vrste i biomonitoring

Detekcija invazivnih vrsta pomoću analiza eDNA može biti aktivna i pasivna. Kod aktivne detekcije, vrsno specifičnim početnicama umnaža se DNA samo one vrste za koju se sumnja da je ili bi mogla biti invazivna na određenom području, a kod pasivne detekcije, pomoću metabarkodiranja analizira se više vrsta odjednom pa se može detektirati vrsta za koju nije očekivano da se pojavljuje na tom području. Kombinacijom aktivnog i pasivnog nadziranja područja u kojem postoji rizik da se pojavi invazivna vrsta moglo bi se pridonijeti kontroli širenja invazivnih vrsta. Jedina mana analiza eDNA u detekciji invazivnih vrsta su lažni pozitivni i negativni rezultati jer mogu uzrokovati nepotrebne reakcije, a time i ekonomske gubitke ili štetu za okoliš (Deiner i sur. 2017).

Pomoću metabarkodiranja uzoraka okolišne DNA također se može procijeniti razina i učinak zagađenja u nekom području promatrajući sastav zajednica bioindikatorskih vrsta (Ruppert i sur. 2019). Bioindikatorske vrste su organizmi koji se mogu jednostavno nadzirati te njihova prisutnost (ili odsutnost) odražava stanje okoliša u kojem se nalaze (Siddig i sur. 2016).

5.4. Moguće primjene analiza DNA iz okoliša na području Hrvatske

Istraživanja DNA iz okoliša na području Hrvatske postoji vrlo malo, a većinu istraživanja proveli su strani znanstvenici kao istraživanja većih područja od kojih je Hrvatska bila samo dio. Upotrebom eDNA u Hrvatskoj se često promatra rasprostranjenost čovječje ribice (*Proteus anguinus*) u špiljama (Vörös i sur. 2017, Gorički i sur. 2018), a provedeno je i istraživanje analize sastava dijatomeja u krškim rijekama (Kulaš i sur. 2022). Iz navedenog može se zaključiti da su istraživanja eDNA u Hrvatskoj tek u začetku, ali da pokazuju obećavajuće rezultate. Analize eDNA mogle bi se primijeniti na mnogim staništima u Hrvatskoj, pogotovo u nacionalnim parkovima i parkovima prirode te strogo zaštićenim područjima za učinkovitiju kontrolu brojnosti osjetljivih i ugroženih vrsta. Zbog velikog broja špiljskih sustava na području Hrvatske, pomoću analiza eDNA mogla bi se lakše analizirati fauna teško pristupačnih špilja i jama. Upravo zbog velike bioraznolikosti na području Hrvatske analize eDNA mogle bi potaknuti bi otkrivanje novih vrsta, ali i unaprijediti postojeće metode očuvanja zaštićenih vrsta.

6. PREDNOSTI, NEDOSTATCI I IZAZOVI

Prednosti analiza eDNA su točnost i količina podataka koje se mogu dobiti u kratkom roku u odnosu na konvencionalne metode. Također, uz analize eDNA moguće je opaziti veću taksonomsku i genetičku raznolikost u okolišu te prisutnost rijetkih, endemskih ili kriptičnih vrsta. Analize eDNA ne mogu zamijeniti konvencionalne metode, ali ih mogu uvelike upotpuniti tako što pružaju uvid u skrivenu raznolikost nekog okoliša i upućuju buduća istraživanja prema otkrivanju vrsta koje fizički još nisu pronađene na nekom području, ali su zabilježene u eDNA. Zbog brzine degradacije eDNA u vodenim ekosustavima (par sati do nekoliko dana) moguća je učinkovita procjena trenutnog stanja sastava mikrobiote i faune u jezerima, uzgajalištima, morima i rijekama (Collins i sur. 2018). Kroz nedavne napretke u tehnologiji sekvenciranja i PCR reakcija omogućena je i točna kvantifikacija okolišne DNA (Hoshino i sur. 2021), no u budućim istraživanjima treba se pronaći poveznica između količine eDNA i biomase organizama da se pomoću eDNA može dobiti točnija procjena brojnosti vrste na nekom staništu. Velika prednost analiza eDNA je neinvazivnost metoda prikupljanja uzoraka što nije slučaj s konvencionalnim metodama kod kojih se jedinice moraju fizički prikupiti za daljnje analize. Budući da nema potrebe za prikupljanjem cjelovitih organizama olakšano je istraživanje teško dostupnih i nepristupačnih staništa kao što su duboka mora i podzemni sustavi te već postoji niz istraživanja koja otkrivaju veliku raznolikost vrsta i moguće nove vrste na ovim nepristupačnim staništima (npr. Sinniger i sur. 2016, Everett i Park 2018, West i sur. 2020).

Nedostatci analiza eDNA su problemi kod odabira DNA biljega i početnica jer mogućnost razlučivanja vrsta unutar neke skupine ovisi o odabiru odgovarajućeg biljega te neki biljezi ne mogu učinkovito razlikovati vrste unutar iste taksonomske skupine. Zbog relativno kratkih fragmenata eDNA koji se umnožavaju reakcijom PCR, postoji problem nespecifičnog vezanja početnica na kalupe i umnožavanja DNA vrste koja nije od interesa u istraživanju (Beng i Corlett 2020). Problem su i nepotpune referentne baze podataka koje sadrže malo ili uopće ne sadrže informacije za određene biljege, a ponekad sadrže prekratke ili krivo pridružene sekvencije nekih biljega (Deiner i sur. 2017). Nestandardizirane metode sakupljanja uzoraka također predstavljaju problem jer mogu uzrokovati nereproducibilne i pogrešne rezultate istraživanja ako su loše provedene i neadekvatno opisane u istraživanju (Dickie i sur. 2018). Budući da DNA u okolišu može biti prenošena na različite načine (izmet, strujanje vode, vjetar) teško je utvrditi obitava li

neka vrsta na lokaciji prikupljanja uzorka ili na mnogo udaljenijoj lokaciji. Utvrđivanje vremenskog razmaka nakon kojeg je organizam ispustio DNA u okoliš također je problematično jer eDNA u različitim uvjetima ima drukčije brzine degradacije pa je moguće detektirati vrstu koja se uopće ne nalazi na nekom staništu, ali je u prošlosti tamo ostavila DNA koja je ostala sačuvana (Deiner i sur. 2017). Razvoj pristupačnijih bioinformatičkih metoda također bi pridonio istraživanjima eDNA jer mnoge analize zahtijevaju pomoć informatičkih stručnjaka.

7. ZAKLJUČAK

Analize DNA iz okoliša, zbog jednostavnosti pristupa, počinju imati sve veću primjenu u raznim područjima biologije gdje, uz postojeće tradicionalne metode, mogu dopuniti i unaprijediti način na koji se određeni aspekti okoliša istražuju. Iako se proces analize okolišne DNA sastoji od mnogo, na prvi pogled, kompliciranih koraka, s napretkom istraživanja metode se sve više standardiziraju i postaju pristupačnije istraživačima koji se tek uključuju u istraživanja okolišne DNA. Za uspješnu provedbu istraživanja okolišne DNA potrebno je izabrati odgovarajuću metodu uzorkovanja prema prijedlozima iz postojeće literature za određeni tip supstrata, zatim izolirati DNA iz uzoraka pomoću standardnog ili modificiranog protokola te umnožiti DNA metodom PCR koristeći pažljivo odabrane početnice za DNA biljege koji odgovaraju istraživanoj skupini. Nakon sekvenciranja PCR produkata, sekvencije je potrebno adekvatno obraditi i analizirati pomoću dostupnih bioinformatičkih alata te rezultate pomno interpretirati. Analize DNA danas polako nalaze primjenu u ekologiji, konzervacijskoj biologiji, biologiji invazivnih vrsta, paleontologiji i biomonitoringu u kojima otvaraju nove mogućnosti istraživanja i očuvanja ekosustava. Primjene analiza DNA iz okoliša u Hrvatskoj se tek počinju otkrivati te postoje istraživanja špiljskih vrsta i slatkovodnih dijatomeja koja pokazuju obećavajuće rezultate. Uz mnoge prednosti kao što su brza analiza velikog broja uzoraka te jednostavnost i neinvazivnost uzorkovanja, analize DNA iz okoliša imaju i nedostatke u smislu relativno nestandardiziranih metoda, nepotpunih baza podataka, kontaminacije uzoraka i problema s lažnim pozitivnim i negativnim rezultatima. Rješavanjem problema metodologije i optimizacijom procesa, analize DNA iz okoliša u budućnosti mogu nadograditi postojeće metode i promijeniti način na koji istražujemo okoliš.

8. LITERATURA

Banchi, E., Ametrano, C. G., Stanković, D., Verardo, P., Moretti, O., Gabrielli, F., ... Muggia, L. (2018): DNA metabarcoding uncovers fungal diversity of mixed airborne samples in Italy. **PloS one** 13(3): e0194489.

Banerjee, P., Stewart, K. A., Antognazza, C. M., Bunholi, I. V., Deiner, K., Barnes, M. A., ... Chen, C. Y. (2022): Plant–animal interactions in the era of environmental DNA (eDNA)—A review. **Environmental DNA**

Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., Lodge, D. M. (2014): Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. **Environmental science & technology** 48(3): 1819-1827.

Bazinet, A. L., Cummings, M. P. (2012): A comparative evaluation of sequence classification programs. **BMC bioinformatics** 13(1): 1-13.

Beng, K. C., Corlett, R. T. (2020): Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. **Biodiversity and Conservation** 29(7): 2089-2121.

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Sayers, E. W. (2012): GenBank. **Nucleic acids research** 41(D1): 36-42.

Collins, R. A., Wangenstein, O. S., O’Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., Genner, M. J. (2018): Persistence of environmental DNA in marine systems. **Communications Biology** 1(1): 1-11.

Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., ... Bernatchez, L. (2017): Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. **Molecular ecology** 26(21): 5872-5895.

Dickie, I. A., Boyer, S., Buckley, H. L., Duncan, R. P., Gardner, P. P., Hogg, I. D., ... Weaver, L. (2018): Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. **Molecular Ecology Resources** 18(5): 940-952.

Echeverría-Beirute, F., Varela-Benavides, I., P Jiménez-Madriral, J., Carvajal-Chacon, M., Guzmán-Hernández, T. (2021): eDNA extraction protocol for metagenomic studies in tropical soils. **BioTechniques** 71(6): 580-586.

Everett, M. V., Park, L. K. (2018): Exploring deep-water coral communities using environmental DNA. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography** 150: 229-241.

Gorički, Š., Presetnik, P., Prosenc-Zmrzljak, U., Gredar, T., Blatnik, M., Kogovšek, B., ... Hudoklin, A. (2018): Development of eDNA methods for monitoring two stygobiotic species of the Dinaric Karst, *Proteus anguinus* and *Congerina jalzici*, using digital PCR. **Natura Sloveniae** 20(2): 47-50.

Guardiola, M., Wangenstein, O. S., Taberlet, P., Coissac, E., Uriz, M. J., Turon, X. (2016): Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. **PeerJ** 4: e2807.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 270(1512): 313-321.

Hollingsworth, P. M. (2011): Refining the DNA barcode for land plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108(49): 19451-19452.

Hoshino, T., Nakao, R., Minamoto, T. (2021): Simultaneous absolute quantification and sequencing of fish environmental DNA in a mesocosm by quantitative sequencing technique. **Scientific Reports** 11(1): 1-9.

Hunter, M. E., Ferrante, J. A., Meigs-Friend, G., Ulmer, A. (2019): Improving eDNA yield and inhibitor reduction through increased water volumes and multi-filter isolation techniques. **Scientific Reports** 9(1): 1-9.

Kraaijeveld, K., De Weger, L. A., Ventayol García, M., Buermans, H., Frank, J., Hiemstra, P. S., Den Dunnen, J. T. (2015): Efficient and sensitive identification and quantification of airborne pollen using next-generation DNA sequencing. **Molecular ecology resources** 15(1): 8-16.

- Kulaš, A., Udovič, M. G., Tapolczai, K., Žutinić, P., Orlić, S., Levkov, Z. (2022): Diatom eDNA metabarcoding and morphological methods for bioassessment of karstic river. **Science of The Total Environment** 829: 154536.
- Lynggaard, C., Bertelsen, M. F., Jensen, C. V., Johnson, M. S., Frøslev, T. G., Olsen, M. T., Bohmann, K. (2022): Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. **Current Biology** 32(3): 701-707.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology** 51: 263-273.
- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E. (2009): The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. **FEMS Microbiology Letters** 296(1): 97-101.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. (2007): BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). **Molecular ecology notes** 7(3): 355-364.
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., Rahman, M. S. (2019): Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. **Global Ecology and Conservation** 17: e00547.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences** 74(12): 5463-5467.
- Shaw, J. L. A., Clarke, L. J., Wedderburn, S. D., Barnes, T. C., Weyrich, L. S., Cooper, A. (2016): Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. **Biological Conservation** 197: 131-138.
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., Hajibabaei, M. (2012): Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular ecology** 21(8): 1794-1805.
- Siddig, A. A., Ellison, A. M., Ochs, A., Villar-Leeman, C., Lau, M. K. (2016): How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. **Ecological Indicators** 60: 223-230.

Sinniger, F., Pawlowski, J., Harii, S., Gooday, A. J., Yamamoto, H., Chevaldonné, P., ... Creer, S. (2016): Worldwide analysis of sedimentary DNA reveals major gaps in taxonomic knowledge of deep-sea benthos. **Frontiers in Marine Science** 3: 92.

Starček, K. (2021): Izolacija DNK molekule ovisno o vrsti materijala životinjskog podrijetla. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb.

Thomsen, P. F., Willerslev, E. (2015): Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. **Biological conservation** 183: 4-18.

Tong, X., Xu, H., Zou, L., Cai, M., Xu, X., Zhao, Z., ... Li, Y. (2017): High diversity of airborne fungi in the hospital environment as revealed by meta-sequencing-based microbiome analysis. **Scientific Reports** 7(1): 1-8.

Trupković, R. (2018): Nove metode sekvenciranja DNA. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju, Osijek.

Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., Yamanaka, H. (2019): The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. **Environmental DNA** 1(2): 99-108.

Vörös, J., Márton, O., Schmidt, B. R., Gál, J. T., Jelić, D. (2017): Surveying Europe's only cave-dwelling chordate species (*Proteus anguinus*) using environmental DNA. **PloS one** 12(1): e0170945.

West, K. M., Richards, Z. T., Harvey, E. S., Susac, R., Greal, A., Bunce, M. (2020): Under the karst: detecting hidden subterranean assemblages using eDNA metabarcoding in the caves of Christmas Island, Australia. **Scientific reports** 10(1): 1-15.