

Okolišna DNA u istraživanju mora

Ćurko, Tena

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:217:546266>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tena Ćurko

Okolišna DNA u istraživanju mora

Završni rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Tena Ćurko

Environmental DNA in sea research

Bachelor thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tatjane Bakran-Petricioli.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Okolišna DNA u istraživanju mora

Tena Ćurko

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Okolišna DNA (eDNA) može biti definirana kao rezervoar DNA prisutan u okolišnom uzorku koji uključuje izvanstaničnu i unutarstaničnu DNA. To je genetski materijal sakupljen iz okolišnog uzorka koji ne sadrži razlikovne značajke izvornih makro-organizama. Potencijalni izvori eDNA su svi biološki materijali organizama, a razgradnja eDNA ovisi o različitim abiotičkim uvjetima. eDNA je od izrazite važnosti u istraživanjima bioraznolikosti okoliša, jer je analiza eDNA jednostavna i jeftina te omogućuje kvantitativne procijene biomase i brojnosti jedinki i vrsta. Promijene okolišnih uvjeta utječu na okolišnu DNA zbog čega se analiza eDNA često koristi u ekologiji. Osim klimatskih promjena tu su i sezonske promjene abiotičkih čimbenika koje značajno utječu na degradaciju eDNA. Mediteran je mjesto izrazite bioraznolikosti istraživane tradicionalnim i modernim metodama. U moderno doba ta bioraznolikost ugrožena je neautohtonim vrstama čije je praćenje olakšano analizom okolišne DNA.

Ključne riječi: okolišna DNA, bioraznolikost, biomonitoring, Mediteran, sekvenciranje

(18 stranica, 8 slika, 1 tablica, 17 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Tatjana Bakran-Petricioli

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Environmental DNA in sea research

Tena Ćurko

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Environmental DNA (eDNA) can be defined as the DNA pool recovered from an environmental sample that includes both extracellular and intracellular DNA. Here, eDNA is defined as the genetic material obtained from a water sample containing no distinguishing characters of original macro-organisms. Potential sources of eDNA are all the biomaterials of organisms. Degradation of eDNA depends on different abiotic conditions. eDNA analysis is of great importance in research and determination of environmental biodiversity because it is a simple and cost-effective method that also enables quantitative assessment of biomass and abundance of individuals and species. Changes in environment reflect in environmental DNA and therefore the eDNA analysis is often used in ecology. Besides climate change there are also seasonal changes of abiotic factors that significantly affect degradation of eDNA. The Mediterranean is a hotspot of biodiversity, researched using traditional and modern methods. In modern times this biodiversity is threatened by non-indigenous species whose monitoring is facilitated with environmental DNA analysis.

Keywords: environmental DNA, biodiversity, biomonitoring, Mediterranean, sequencing
(18 pages, 8 figures, 1 tables, 17 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Associate Professor Tatjana Bakran-Petricioli.

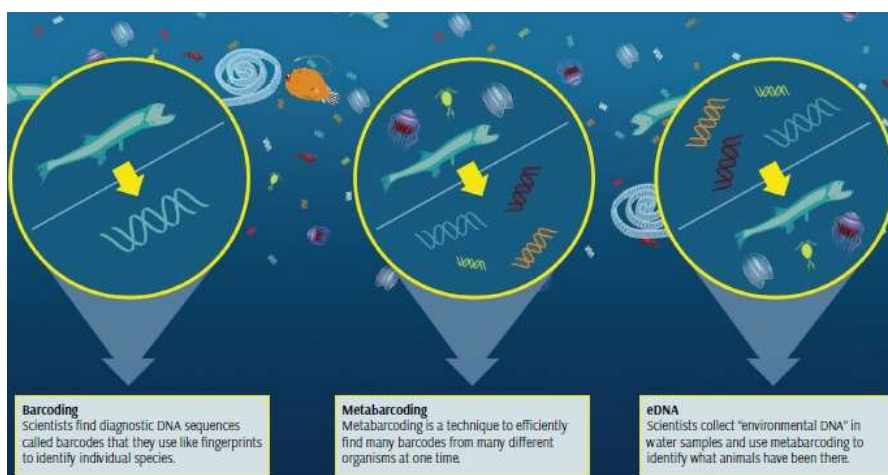
SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. NASTANAK I RAZGRADNJA eDNA U MORSKOM OKOLIŠU	2
2.1. Nastanak eDNA	2
2.2. Transport	4
2.3. Opstojanje i razgradnja	4
3. MONITORING MORSKIH VRSTA UZ POMOĆ eDNA	6
3.1. Metode i primjena	6
3.2. Detekcija vrsta	8
3.3. Inventarizacija morskih vrsta uz pomoć eDNA	9
4. OKOLIŠNI UVJETI	10
4.1. eDNA u ekologiji	10
4.2. Sezonski utjecaj	11
5. MEDITERAN	12
5.1. Biomonitoring morskih alohtonih vrsta	12
5.2. Konzervacijski paradoks	14
7. ZAKLJUČAK	15
8. LITERATURA	16
9. ŽIVOTOPIS	18

1. UVOD

Okolišna DNA, eDNA, genetički je materijal dobiven direktno iz okolišnih uzoraka, kao što su tlo, sediment i voda, bez prepoznatljivih dijelova izvornog biološkog materijala (Thomsen i Willerslev 2015). Kako su organizmi u interakciji s okolišem dolazi do konstantnog ulaska DNA molekula u njega u obliku izvanstaničnih slobodnih oblika u otopini ili vezanih za čestice, te u unutarstaničnom obliku gdje se DNA nalazi unutar stanice (Hansen i sur. 2018)

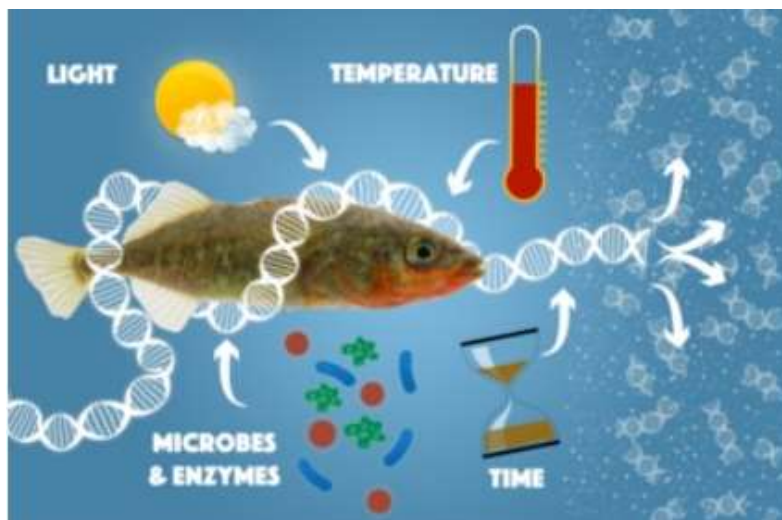
S obzirom na konstantno opadanje bioraznolikosti na Zemlji potrebne su analitičke metode istraživanja bioraznolikosti kako bi ju se lakše moglo pratiti. Analiza eDNA jedna je od takvih metoda, koja uz tehnologiju DNA sekvenciranja daje mogućnost uspješnog monitoringa bioraznolikosti. Sakupljanje i analiza uzoraka morske vode za eDNA u mnogo se slučajeva pokazala kao jeftina, osjetljiva i neinvazivna metoda za ispitivanja prisutnosti ili odsutnosti vrsta za razliku od drugih uspostavljenih tehnika monitoringa koje ovise o hvatanju cijelih organizama (Hansen i sur. 2018). eDNA omogućava determinaciju organizama vrlo malih dimenzija što je tradicionalnim metodama gotovo nemoguće, ali i identifikaciju još nepoznatih vrsta ili pak alohtonih (invazivnih) vrsta za istraživano područje. Uz metodu eDNA treba spomenuti DNA barkodiranje, što je metoda identifikacija pojedine vrste prema njenom barkodu tj. DNA otisku („fingerprintu“), i metabarkodiranje, što je tehnika sakupljanja mnogo barkodova različitih vrsta, jer se sakupljena eDNA analizira metodom metabarkodiranja kako bi se identificirala većina prisutnih organizama u uzorku (Douglas i sur. 2020) (slika 1).



Slika 1. Pojednostavljen prikaz metoda DNA barkodiranja, metabarkodiranja te eDNA metode (preuzeto iz Douglas i sur. 2020).

2. NASTANAK I RAZGRADNJA eDNA U MORSKOM OKOLIŠU

Količina eDNA fragmenata prisutna u okolišnom uzorku je kontrolirana trima procesima: stopi nastajanja, stopi degradacije i fizičkom transportu (Hansen i sur. 2018). Potencijalnih izvora eDNA je mnogo, uključujući izmet, sluz, ljuske, tkiva, gamete i ostali biološki materijal. Ovisno o molekularnom stanju eDNA, odnosno o tome radi li se o slobodnim fragmentima ili DNA koja se nalazi unutar mitohondrija kao i o stanju abiotičkih i biotičkih okolišnih uvjeta, određuje se njihova vremenska postojanost. U većini slučajeva, do razgradnje eDNA dolazi odmah nakon njenog otpuštanja u okoliš. S druge strane, okolišni uvjeti u moru rezultiraju vrlo širokom i varijabilnom raspodjelom eDNA unutar morskog okoliša (**slika 2**).

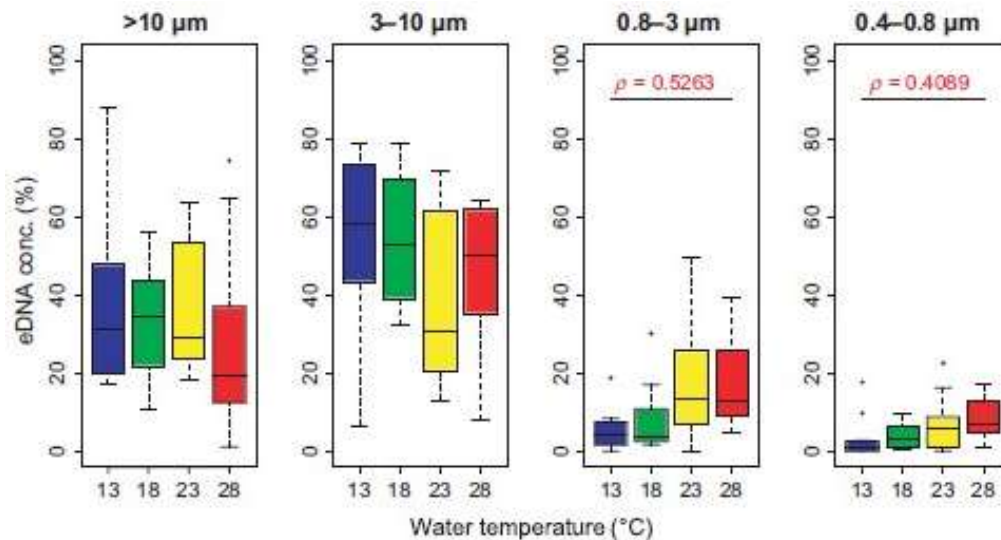


Slika 2. Uvjeti i nastajanje okolišne DNA. (preuzeto sa <https://www.usgs.gov/special-topics/water-science-school/science/environmental-dna-edna>).

2.1. Nastanak eDNA

Stopa nastanka eDNA makro-organizama ovisi o veličini jedinke, biomasi, prehrani, zdravstvenom stanju, godišnjem dobu i spolu. Ovisno o promjenama biotičkih i abiotičkih čimbenika, prvenstveno promjenama koncentracije otopljenog kisika u moru i temperature, količina nastale eDNA varira zbog stresa koje organizam proživljava, promjena u metabolizmu i zdravlju izvornog organizma. Istraživanja Jo i sur. (2019) na japanskoj skuši, *Trachurus japonicus* (Temminck i

Schlegel, 1844), pokazala su kako količina nastale eDNA varira ovisno o biomasi jedinki te da temperatura utječe na stopu nastajanja (slika 3) jer metabolizam organizama ovisi o temperaturi okoliša zbog čega pri višim temperaturama mora riblje jedinke doživljavaju stres što vodi do povećanja količine nastale eDNA.



Slika 3. Ovisnost koncentracije eDNA o temperaturi okoliša. Usporedba je napravljena pri temperaturama mora 13°C, 18°C, 23°C i 28°C pri čemu se promatra eDNA dimenzija >10 µm, 3-10 µm, 0,8-3 µm i 0,4-0,8 µm. Dimenzije 0,8-3 µm i 0,4-0,8 µm eDNA pokazale su pozitivnu korelaciju s temperaturom mora ($p < 0,01$), dok dimenzije >10 µm i 3-10 µm eDNA nisu pokazale gotovo nikakvu korelaciju s temperaturom mora ($p > 0,05$) (preuzeto iz Jo i sur. 2019).

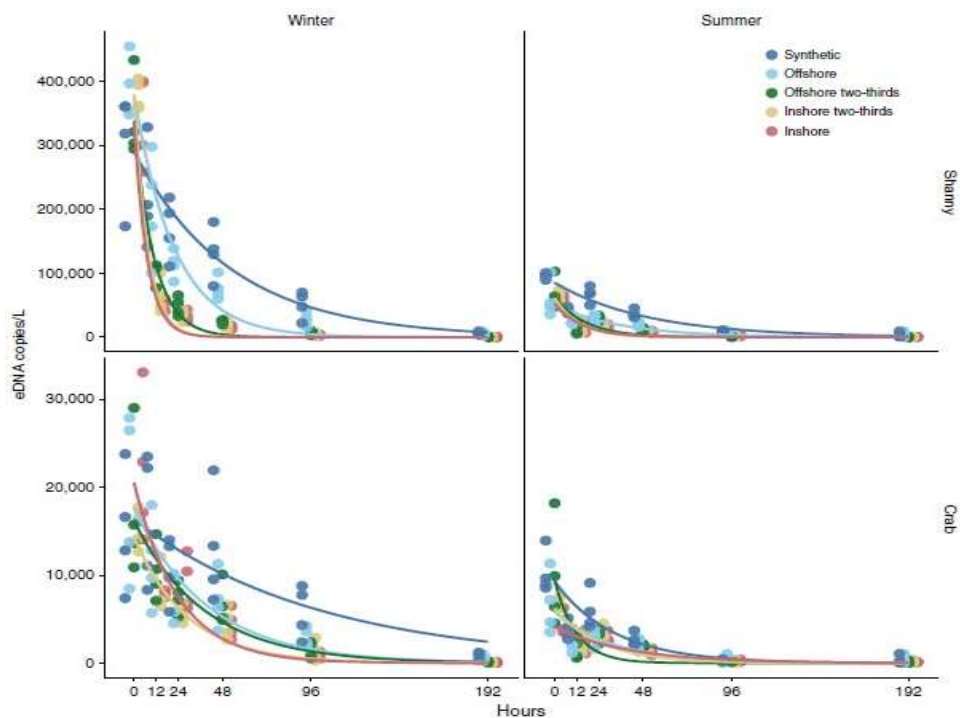
S obzirom na razlike u veličini i biomasi između jedinki iste, pa tako i različitih vrsta, dolazi do nastanka različitih količina okolišne DNA što može utjecati na interpretaciju analize eDNA. Velike jedinke riba imaju manju ukupnu površinu tijela izloženu vanjskom okolišu od skupine manjih riba jednake ukupne biomase, što dovodi do toga da velika skupina i znatno manjih riba proizvodi veće količine eDNA. Također, o veličini tijela jedinke kao i njihovoj starosti ovisi metabolizam. Pošto manji organizmi imaju općenito brži metabolizam, skupina manjih organizama proizvodi više eDNA od jednog velikog organizma iste biomase, ali sporijeg metabolizma. Sve ovo u pitanje dovodi teorije odnosa količine nastale eDNA i količine, odnosno veličine, organizama, dodatno uz to kod nekih vrsta riba u fazi ličinke i u juvenilnoj fazi veza metabolizma i veličine tijela ne ovisi o biomasi. Zbog toga je od velike važnosti prilikom analize eDNA uzimati u obzir veličinu organizma, životni stadij te metaboličku aktivnost.

2.2. Transport

Unutar morskog okoliša fragmenti eDNA mogu biti transportirani preko izrazito velikih udaljenosti što je posljedica raznolikosti biotičkih i abiotičkih uvjeta koji utječu na razgradnju eDNA, kao i zajedničkog utjecaja morskih struja, morskih mijena te rasprostiranja organizma. Utvrđeno je kako u moru fragmenti eDNA, ovisno o prosječnoj brzini morskih struja, mogu potencijalno putovati više od 600 km u samo tjedan dana (Hansen i sur. 2018), a izmjereno vrijeme opstojanja eDNA bilo je maksimalno 7 dana, nakon čega je fragmente eDNA izrazito teško bilo detektirati (Thomsen i sur. 2012). Još jedan oblik transporta koji se pojavljuje je tonjenje fragmenata eDNA većih dimenzija pod utjecajem gravitacijske sile.

2.3. Opstojanje i razgradnja

Važno je poznavati vrijeme opstojanja okolišne DNA u određenim sistemima jer je moguća pojava eDNA nekog organizma na području na kojem trenutno ne živi ili nikad nije ni živio, ali je zbog transporta eDNA ondje detektirana. Isto tako moguće je da se eDNA nekog organizma niti ne detektira zbog malobrojnih jedinki ili lažnog negativnog rezultata. Različita istraživanja su utvrdila kako je vrijeme opstojanja eDNA u morskoj vodi dulje od vremena opstojanja u slatkoj vodi zbog višeg saliniteta, stabilnije temperature, višeg pH i veće ionske vrijednosti. Više temperature morske vode u pravilu produljuju vrijeme opstojanja eDNA (vidljivo na **slici 4** za jednu vrstu ribe i jednu vrstu raka). Uzorkovanjem morske vode i eDNA te kvantifikacijom fragmenata eDNA kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (q Polymerase Chain Reaction, qPCR), Thomsen i sur. (2012) utvrdili su kako i najmanji fragmenti eDNA bivaju u potpunosti degradirani u nekoliko dana tj. od 0,9 do 6,7 dana.



Slika 4. Eksponencijalna degradacija eDNA u morskoj vodi u ljetnim i zimskim uvjetima što ukazuje na ovisnost degradacije o temperaturi okoliša (preuzeto iz Collins i sur. 2018).

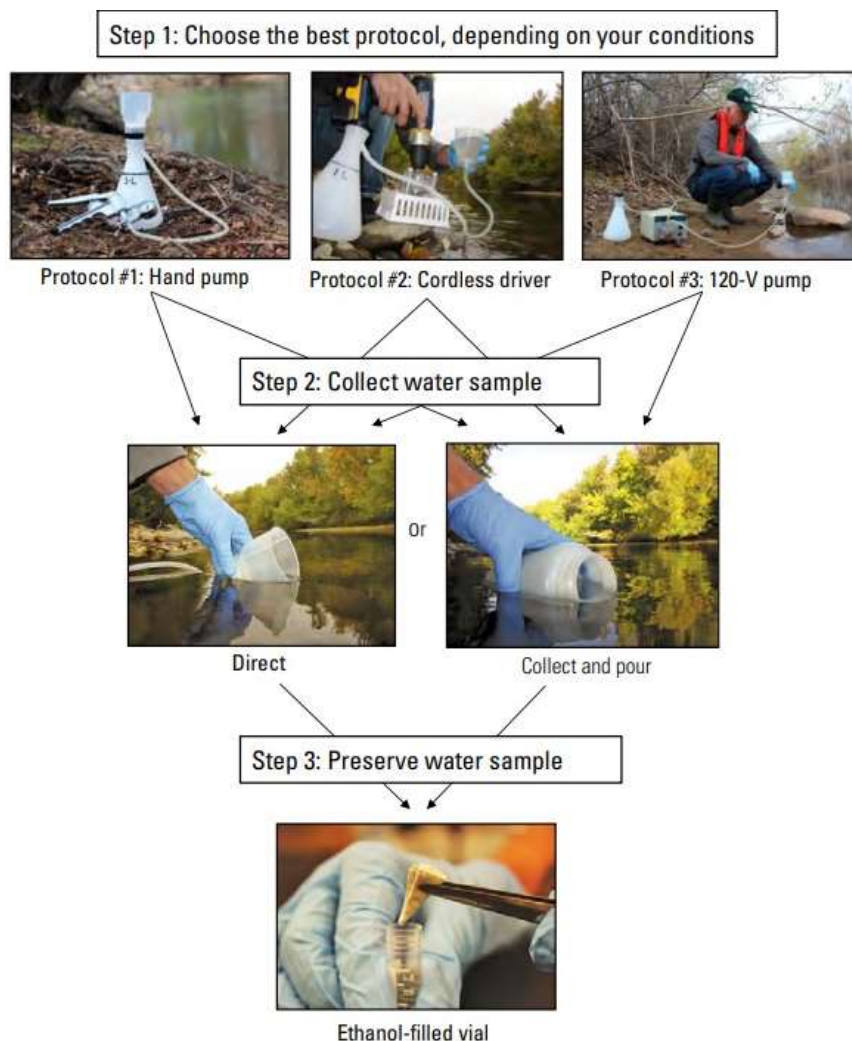
Razgradnja eDNA započinje u trenutku kada fragmenti dopiju u okoliš, a ovisi o abiotičkim čimbenicima, prvenstveno temperaturi, pH vrijednosti mora, salinitetu i ultraljubičastoj radijaciji. Temperatura morske vode smatra se ključnom u procesu degradacije eDNA, no utvrđeno je kako ona ne utječe direktno na degradaciju eDNA već indirektno enzimatskom hidrolizom mikroba i izvanstaničnih nukleinskih kiselina (Jo i sur. 2018). Od drugih uzroka degradacije eDNA valja izdvojiti ultraljubičasto zračenje kao i djelovanje mikroba.

3. MONITORING MORSKIH VRSTA UZ POMOĆ eDNA

Saznanje o rasprostiranju vrsta je od izrazite važnosti za ekološko upravljanje okolišem i konzervacijsku biologiju (Rees i sur. 2014). Monitoring rasprostiranja je od izrazite važnosti za ekologiju zbog razumijevanja odnosa vrsta i jedinki, ali i novih pojava i situacija koje su posljedica klimatskih promjena. U konzervacijskoj biologiji monitoring eDNA je koristan za proučavanje bioraznolikosti mora i oceana. Primjena eDNA široka je upravo u istraživanjima i opisu širokog filogenetičkog raspona vrsta u moru te je od izrazite važnosti u razumijevanju života u moru, ali i na Zemlji općenito. Ova metoda omogućuje monitoring unutar različitih okolišnih uvjeta u moru te je pouzdanija i korisnija od onih starijih, tradicionalnih, zbog mogućnosti istraživanja vrsta koje nije potrebno fizički uloviti. Metoda je i koja proširuje mogućnosti tradicionalnih metoda kada su u pitanju prolazne vrste, no prednost tradicionalnih metoda nad eDNA metodom je mogućnost razlikovanja živih od mrtvih organizama (Rees i sur. 2014).

3.1. Metode i primjena

Korištenje eDNA analize u svrhu monitoringa morskih populacija proizašlo je iz metoda korištenih za procjenu raznolikosti makroorganizama u antičkim sedimentima. Danas se metoda analize eDNA sastoji od uzimanja uzorka morske vode i amplifikacije pronađenih nukleinskih kiselina metodom PCR. Količina sakupljenog uzorka morske vode može varirati od 15 mL do 10 L ovisno o mjestu sakupljanja, no standardni volumen uzorka je od 1 do 2 L i većinom se uzorkuje na tri različita mjesta iste lokacije radi veće šanse prikupljanja vrsta (Rees i sur. 2014). Također, s obzirom na različite količine eDNA na određenim područjima kao i na raznolikost uvjeta, morska voda se prikuplja na više načina. Jedan takav je pumpanje vode kroz filtere s peristaltikom ili pak sakupljanje površinskog sloja morske vode djelomičnim uranjanjem spremnika nakon čega slijedi filtriranje ili precipitacija etanolom (Rees i sur. 2014) (prikazano na **slici 5**).



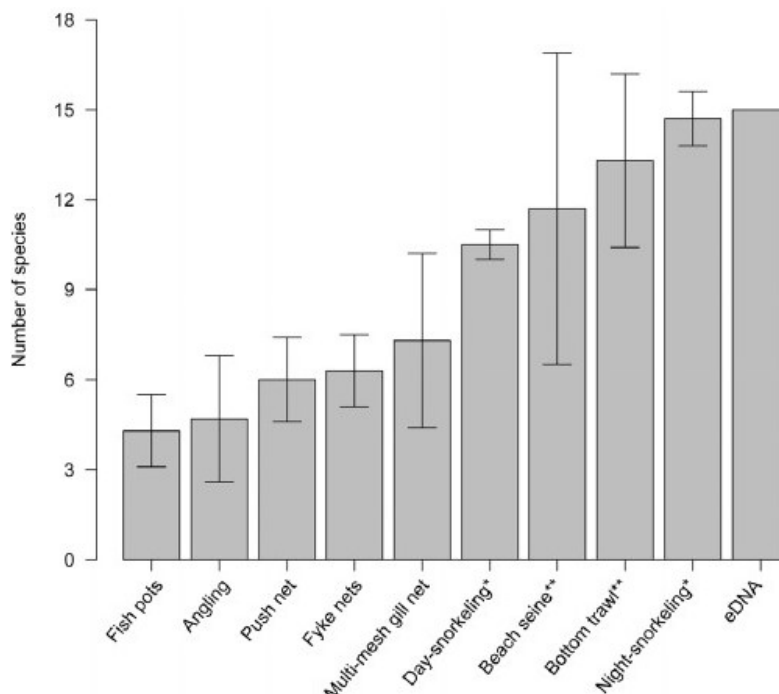
Slika 5. Postupak prikupljanja uzorka morske vode za istraživanja eDNA (preuzeto iz Laramie i sur. 2015).

Detekcija eDNA makro i mikro organizama u morskoj vodi se razlikuje jer je eDNA makroorganizama prisutna kao istinska eDNA tj. kao stanični ostaci i slobodna DNA, dok je kod mikroorganizama moguća detekcija DNA koja je izvorno iz cijelog i u morskoj vodi prisutnog organizma (Thomsen i sur. 2012).

3.2. Detekcija vrsta

Detekcija vrsta organizama uz pomoć eDNA vrlo je korisna kako bi se spoznala bioraznolikost nekog okoliša, a da ne uzimamo žive jedinke iz njega. Procjena rasprostranjenosti vrsta nužna je za određivanje bioraznolikosti okoliša, no određene je vrste teško detektirati u nekim stadijima razvoja kao i u nekim vremenskim periodima (Ficetola i sur. 2008).

Thomsen i sur. (2012) utvrdili su kako je metoda eDNA pogodna u detekciji vrsta makroorganizama (prvenstveno riba) jer morska voda sadrži velike količine njihovog genetičkog materijala. Usprkos sumnjama o primjenjivosti metode istraživanja eDNA na morskoj vodi zbog njena nadasve velikog volumena, utjecaja morskih struja i valova te mogućih utjecaja saliniteta na degradaciju eDNA, utvrdili su kako je ova metoda vrlo pogodna za primjenu. Dapače, moguće ju je primijeniti u bilo kojem morskom okolišu i uz to je izrazito precizna i objektivna metoda identifikacije različitih vrsta. Potencijalni problemi prilikom identifikacija vrsta s eDNA metodom su nedovoljno poznavanje raspršenosti eDNA u morskom okolišu i pristranost afiniteta početnica u metodi PCR na određene sekvence DNA molekula. Već navedeno istraživanje je pokazalo učinkovitost eDNA metode naspram nekih drugih metoda identifikacije što je prikazano na **slici 6**.



Slika 6. Broj identificiranih ribljih vrsta pomoću 9 konvencionalnih metoda naspram broja identificiranih ribljih vrsta metodom eDNA (preuzeto iz Thomsen i sur. 2012).

Iz rezultata je vidljivo kako je ova metoda bila najuspješnija prilikom identifikacije vrsta makroorganizama.

3.3. Inventarizacija morskih vrsta uz pomoć eDNA

Eksperiment popisivanja vrsta morskih riba unutar velikog mezokozmosa proveli su Kelly i sur. (2014) u akvariju u Monterey-u s određenim brojem vrsta makroorganizama koji su uključivali i morske kornjače uz ribe. Kao početnice u metodi su koristili mitohondrijsku DNA (mtDNA) te su poznajući vrste unutar promatranog mezokozmosa bili u mogućnosti utvrditi preciznost metode kada je u pitanju inventarizacija vrsta. Od prisutnih taksonomskih grupa organizama u akvariju/mezokozmosu eDNA metodom je detektirana do razine roda nekolicina vrsta riba koštunjača naspram riba hrskavičnjača i morskih kornjača (**tablica 1**). One nisu detektirane eDNA metodom jer su u istraživanju korištene specifične sekvence, početnice 12S, koje imaju dvije razlike u uzvodnoj regiji za vezanje početnica hrskavičnjača i morskih kornjača, stoga su bile znatno pogodnije za detekciju koštunjača gdje dolazi do amplifikacije. Također, u ovom mezokozmosu pronađena je eDNA morske vidre što ukazuje i na mogućnost monitoringa morskih sisavaca metodom eDNA.

Tablica 1. Morske vrste unutar mezokozmosa u Monterey Bay akvariju i uspješnost njihove detekcije metodom eDNA (preuzeto iz Kelly i sur. 2014).

Species	Common name	Family	Approx.count	Estimated biomass in tank (kg)	Lowest taxonomic rank detected with eDNA
Bony fish					
<i>Coryphaena hippurus</i>	Dolphinfish	Coryphaenidae	6	84	Genus
<i>Mola mola</i>	Ocean sunfish	Molidae	1	1,000	No detect
<i>Naukrates doctor</i>	Pilot fish	Carangidae	17	12.75	Family
<i>Sarda chiliensis</i>	Pacific bonito	Scombridae	15	45	Family
<i>Sardinops sagax</i>	Sardine	Clupeidae	13,000	2,600	Genus
<i>Scomber japonicus</i>	Chub mackerel	Scombridae	17	7.7	Genus
<i>Thunnus albacares</i>	Yellowfin tuna	Scombridae	11	748	Genus
<i>Thunnus orientalis</i>	Pacific bluefin tuna	Scombridae	7	1,890	Genus
Cartilaginous fish					
<i>Carcharhinus plumbeus</i>	Sandbar shark	Carcharhinidae	1	65	No detect
<i>Dasyatis violacea</i>	Pelagic stingray	Dasyatidae	2	5	No detect
<i>Sphyrna lewini</i>	Hammerhead shark	Sphymidae	2	109	No detect
Turtle					
<i>Chelonia mydas</i>	Green sea turtle	Cheloniidae	2	258	No detect

Zbog nedovoljnog poznavanja sekvenci različitih morskih vrsta eDNA metoda može biti, usprkos svemu već navedenom, nedostatna zbog nemogućnosti detektiranja vrsta čiji nam je genom slabo poznat ili nepoznat (rijetke ili slabo istražene vrste). Valja napomenuti da je određene vrste unutar mezokozmosa teže detektirati i zbog manje proizvodnje eDNA u odnosu na druge vrste što dovodi do neravnomjernog omjera količine eDNA u morskom okolišu te njihove manje amplifikacije u metodi PCR.

4. OKOLIŠNI UVJETI

Morski ekosistemi se mijenjaju velikom brzinom kako se oceani zagrijavaju i postaju sve kiselij (Berry i sur. 2019). Globalno zatopljenje kao i zagađenje uvelike pridonose ekološkim problemima današnjice koji ne zaobilaze morske okoliše i značajno utječu na bioraznolikost mora. Promjenu u bioraznolikosti kao izravnu posljedicu globalnih klimatskih i okolišnih promjena moguće je pratiti eDNA metodom kako ne bi bilo potrebno koristiti ogromne količine podataka i resursa. Osim istraživanja promjena bioraznolikosti kao rezultata klimatskih promjena, eDNA se koristi i u istraživanju bioraznolikosti općenito te ponašanja organizama u okolišu.

4.1. eDNA u ekologiji

Okolišna DNA od velikog je značaja za ekologiju jer se uz pomoć nje prilikom istraživanja moguće fokusirati na prehranu, rasprostranjenost vrsta, trofičke interakcije i bioraznolikost (Berry i sur. 2019). Detekcijom eDNA unutar izmeta i fekalnih peleta organizama moguće je utvrditi veze u hranidbenom lancu morskog okoliša što pak dovodi do spoznaja o ponašanjima organizama kao i o njihovoj brojnosti (Yoccoz 2012). Balint i sur. (2018) navode da kako bi mogli spoznati današnju bioraznolikost okoliša potrebno je poznavati dugotrajnu dinamiku okoliša. To je nemoguće bez poznavanja temporalne dinamike koja upućuje na veze između okolišnih promjena i ekološke dinamike što omogućuje predviđanja o stanju bioraznolikosti u budućnosti. Okolišna DNA

pokazala se kao potencijalno dobra metoda upravo u otkrivanju te temporalne dinamike okoliša. eDNA osigurava kontinuirane temporalne podatke o bioraznolikosti tijekom duljeg perioda vremena za brojne vrste i geografska područja. Moguće je prikupiti informacije o promjenama u relativnom obilju vrsta tijekom vremena koristeći više sekvenci eDNA koje se očitavaju kao kvantitativni indeksi. Osim toga, dugoročni monitorinzi omogućuju saznanja o utjecaju značajnih događaja na populacije.

4.2. Sezonski utjecaj

Metoda eDNA djelomično ovisi o godišnjem dobu provođenja istraživanja jer npr. degradacija okolišne DNA je često pod utjecajem okolišnih uvjeta pa stoga varira ovisno o dijelu godine. Monitoring vrsta u samo jednom određenom vremenskom periodu je neadekvatan za sagledavanje ukupne bioraznolikosti i promjena u raznovrsnosti vrsta u okolišu. Berry i sur. (2019) istraživanjima metodom eDNA tijekom nekoliko godina utvrdili su kako je najveća razlika u detekciji vrsta između ljeta i zime te nešto manja za zimu i proljeće, a najmanja razlika zabilježena je između zime i jeseni te proljeća i ljeta. Za pojedinu vrstu broj jedinki se povećava ovisno o temperaturi morske vode i salinitetu što se smatra posljedicom veze između okolišnih varijabli i sastava fitoplanktona kao glavnog izvora hrane za mnoge organizme. Salter (2018) je istraživao promjene tijekom godinu dana u sjeverozapadnom Mediteranu sakupljajući uzorke morske vode na jednoj postaji svaka dva tjedna. Maksimalna temperatura zabilježena je u kolovozu, a minimalna u veljači dok je salinitet mora prilično konstantan tijekom cijele godine uz izuzetak epizodičnog pada u mjesecu svibnju. Ograničenje fosfata u tom području pokazalo se najznačajnijim za ljetnih mjeseci što je posljedica rapidnog cirkuliranja fosfata, visokih temperatura i niskih koncentracija biološki dostupnog fosfata. Također, pokazalo se da su periodi ograničene količine fosfata u sjeverozapadnom Mediteranu povezani s povećanom cirkulacijom degradirane eDNA te kako u regulaciji prisutnosti degradirane eDNA u prirodnom morskom okolišu veliku ulogu igra mikrobn korištenje eDNA kao izvora otopljenog organskog fosfora. Naravno, kako je već i prije navedeno, na degradaciju eDNA utječu i abiotički faktori tj. temperatura mora, UV zračenje, pH vrijednost mora, količina otopljenog kisika i salinitet mora, no u ovom slučaju taj je utjecaj bio manje značajan zbog relativno malih gradijenata abiotičkih faktora između sezona.

5. MEDITERAN

Mediteran ili Sredozemlje (**slika 7**) područje je izrazite bioraznolikosti koja je dugo vremena istraživana tradicionalnim metodama koje se temelje na morfološkim identifikacijama organizama, ali s novim otkrićima pojavljuju se metode koje koriste molekularne alate kao što su okolišna DNA, DNA barkodiranje i metabarkodiranje (Zangaro i sur. 2021). S klimatskim promjenama i zagađenjima ova izrazita bioraznolikost je pod stalnom prijetnjom, a ni pojave novopridošlih, često invazivnih vrsta koje tome pridonose nisu rijetkost.

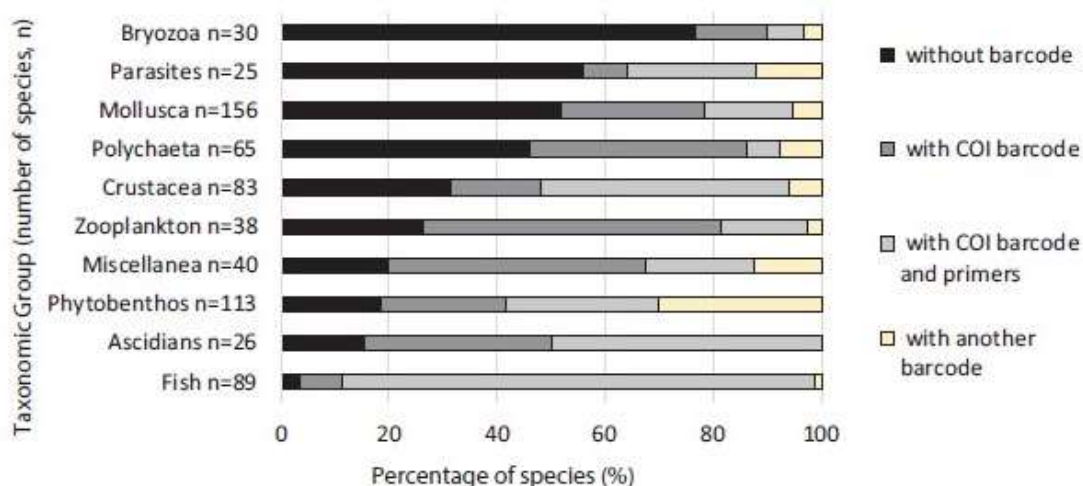


Slika 7. Kartografski prikaz Mediterana (preuzeto sa <https://shimanovskadm.ru/hr/stay/sredizemnoe-more-na-karte-mira-so-stranami-podrobnye-karty-sredizemnogo-morya.html>).

5.1. Biomonitoring morskih alohtonih vrsta

Bioraznolikost Mediteranskog mora ugrožena je pojavom alohtonih vrsta (Non-Indigenous Species, NIS) te je monitoring njihove rasprostranjenosti važan u očuvanju ekosistema. Zangaro i sur. (2021) navode 665 potvrđenih invazivnih vrsta unutar Mediterana koje su svrstali u 10 glavnih taksonomskih grupa (**slika 8**). Navode problem manjka DNA barkodova što ograničava monitoring, ali i da je monitoring eDNA puno prikladnija metoda otkrivanja i kontrole nepoznatih

invazivnih vrsta od tradicionalnih metoda jer se ne svodi samo na morfološku identifikaciju i ne ovisi o veličini istraživanog teritorija kao ni o znanju taksonoma. Istraživanjem su ustanovili kako čak 33% invazivnih vrsta nema nikakvu službenu evidenciju zbog čega ih je detektirati DNA barkodiranjem izrazito teško. Istraživali su učinkovitost DNA barkodiranja te citokrom oksidazu I (COI) kao barkod s ili bez početnica tijekom detekcije i identifikacije invazivnih vrsta. Usmjerivši se na COI barkod, glavni gen korišten za barkodiranje koji se pojavljuje u različitim taksonomskim grupama, ustanovili su kako 45,3% od 382 vrste (vidljivo zajedno s ostalim taksonomskim grupama na **slici 8**) s COI barkodom nemaju javno dostupne početnice. Prema **slici 8** vidljivo je i kako je za pojedine taksonomske grupe stupanj asocijacije s korištenim DNA barkodovima izrazito nizak.



Slika 8. Detektiranje invazivnih vrsta organizama u 10 taksonomskih grupa DNA barkodiranjem i COI barkodovima s ili bez poznatih početnica (preuzeto iz Zangaro i sur. 2021).

COI je vrlo koristan genetički marker jer je širokog opsega sekvenciranja za različita koljena što ga čini pogodnim u identifikaciji vrsta u okolišnim uzorcima. Ipak, za neke vrste/skupine organizama on nije pogodan (dovoljno razlikovan) genetički marker. Problem u korištenju eDNA u monitoringu Mediteranskog mora je u tome da za samo 26% invazivnih vrsta postoje javno dostupne početnice.

5.2. Konzervacijski paradoks

Konzervacijski paradoks je pojava koja ukazuje na to da lokalna bioraznolikost ne opada usprkos ukupnom, svjetskom, opadanju bioraznolikosti. Boulanger i sur. (2021) navode kako dugoročna istraživanja pokazuju da svega 3% obalnih morskih ekosistema doživljava pad lokalnog bogatstva vrsta, a čak 16% istraživanih područja bilježi pozitivan trend u bioraznolikosti. Taj fenomen, paradoks, može biti posljedica ravnoteže između izumiranja vrsta i kolonizacije vrsta na istraživanim lokacijama, odnosno, dolazi do zamjene autohtonih vrsta alohtonim (ponekad) invazivnim vrstama. Također, bioraznolikost područja može se povećati u slučaju smanjenja broja jedinki određene osjetljive vrste, što omogućuje povećanje broja i koegzistenciju više drugih izdržljivijih vrsta. Istraživan je fenomen u zaštićenim područjima, s naglaskom na područja u kojima nije dozvoljeno ništa dirati, tzv. „no take zone“. Zaštićena područja općenito su znana kao efektivni alati očuvanja prirode, koji omogućuju razvoj veće biomase i gustoće živog svijeta unutar svojih granica ali i neposredno izvan njih. No, pokazalo se kako unutar takvih područja postoje dva različita ishoda: manji broj većih predatora što automatski rezultira većom bioraznolikošću manjih organizama ili može doći do pretjeranog razmnožavanja velikih predatora što će uvelike smanjiti bioraznolikost unutar zatvorenog područja. Problem kod proučavanja konzervacijskog paradoksa je nemogućnost determinacije svih prisutnih vrsta, pogotovo onih izrazito malih dimenzija ili nepoznatih, no taj problem je smanjen metodom determinacije vrsta s eDNA kojom je, kako što je i ranije nekoliko puta rečeno, moguća identifikacija većeg broja morskih vrsta bez potrebe hvatanja organizama. Uzimanjem uzoraka eDNA sa 6 „no take zone“ lokacija u Mediteranu, Boulanger i sur. (2021) su došli do zaključka kako se raznolikost vrsta smanjuje ovisno o zaštiti područja. Rezervati većinom zaštitu pružaju organizmima visoke trofičke razine i velike biomase, koji su podložni stradavanju ribolovom dok su na područjima gdje je dozvoljen ribolov zastupljeni organizmi manje biomase i na nižim trofičkim razinama. To bi značilo da ribolov uvelike djeluje na trofičke razine morskih organizama, poglavito riba, jer se fokusira na veće, predatorske organizme čime se povećava količina manjih organizama kojima se predatori obično hrane. S druge strane, unutar zaštićenih područja broj predatora je veći, sličniji pravom prirodnom stanju, što onda smanjuje bioraznolikost manjih organizama.

7. ZAKLJUČAK

Metoda okolišne DNA (eDNA), koja se zasniva na nukleinskim kiselinama koje organizmi ispuštaju na različite načine u okoliš, relativno je nov način identifikacije i monitoringa živih organizama u svim okolišima, pa tako i u moru. Ima svoje prednosti, ali i nedostatke. Pogodna je metoda za identifikaciju manjih organizama, mikrobnih oblika, ali i juvenilnih oblika vrsta, koje je izrazito teško fizički uloviti i na taj način ih tradicionalno identificirati. Radi se o neinvazivnoj metodi koja u osnovi zahtjeva samo sakupljanje uzoraka morske vode, neki oblik filtracije te umnažanje PCR nukleinskih uzoraka. Prilikom izvođenja metode nije potrebno ekstenzivno taksonomsko znanje zbog čega je i pogodna za determinaciju novih i invazivnih vrsta nekih područja. Omogućuje monitoring bioraznolikosti mora velikih razmjera, no još uvijek se radi o djelomično ograničenoj metodi. Nedovoljno poznajemo genome mnogih organizama pa je određene vrste teško identificirati zbog nedostatka dostupnih sekvenci. Isto tako široko korišteni genetički markeri neki put nisu pogodni za sve vrste/skupine organizama. Količina eDNA materijala u morima ovisi o vanjskim čimbenicima, a uz to eDNA se prenosi na razmjerno velike udaljenosti pod utjecajem morskih struja i morskih mijena. Postoji određena korelacija između količine eDNA koju organizam proizvede i njegove biomase, veličine, starosti i slično, što također valja uzeti u obzir prilikom korištenja ove metode u svrhu monitoringa bioraznolikosti. Zaključno, radi se o relativno jeftinoj i brznoj metodi koja je prekretnica u istraživanju bioraznolikosti morskih okoliša diljem svijeta te treba dalje raditi na njenoj optimizaciji.

8. LITERATURA

Balint, M., Pfenninger, M., Grossart, H. P., Taberlet, P., Vellend, M., Leibold, M. A., Englund, G., Bowler, D. (2018) Environmental DNA Time Series in Ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **33(12)**: 945-957. doi.org/10.1016/j.tree.2018.09.003

Berry, T. E., Saunders, B. J. S., Coghlan, M. L., Stat, M., Jarman, S., Richardson, A. J., Davies, C. H., Berry, O., Harvey, E. S., Bunce, M. (2019) Marine environmental DNA biomonitoring reveals seasonal patterns in biodiversity and identifies ecosystem responses to anomalous climatic events. *PLoS Genetics* **15(2)**: e1007943. doi.org/10.1371/journal.pgen.1007943

Boulanger, E., Loiseau, N., Valentini, A., Arnal, V., Boissery, P., Dejean, T., Deter, J., Guellati, N., Holon, F., Juhel, J. B., Lenfant, P., Manel, S., Mouillot, D. (2021) Environmental DNA metabarcoding reveals and unpacks a biodiversity conservation paradox in Mediterranean marine reserves. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **288**: 20210112. doi.org/10.1098/rspb.2021.0112

Collins, R. A., Wangensteen, O. S., O'Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., Genner, M. J. (2018) Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology* **185**. doi: 10.1038/s42003-018-0192-6

Douglas, K. E., Shea, P., Porzecanski, A. L., Naro-Maciel, E. (2020) What's in the Water? Using environmental DNA for Marine Monitoring and Planning. *Lessons in Conservation* **10(1)**: 29-48.

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* **4**: 423-425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118

Hansen, B. K., Bekkevold, D., Clausen, L. W., Nielsen, E. E. (2018) The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries* **19**: 751-768. doi.org/10.1111/faf.12286

Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R., Minamoto, T. (2019) Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution* **9**: 1135-1146. doi.org/10.1002/ece3.4802

Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., Crowder, L. B. (2014) Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLoS ONE* **9(1)**: e86175. doi:10.1371/journal.pone.0086175

Laramie, M. B., Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Strickler, K. M. (2015) Environmental DNA Sampling Protocol – Filtering Water to Capture DNA from Aquatic Organisms. U.S. Geology Survey Techniques and Methods, Knjiga 2, Poglavlje A13, 15 str. doi.org/10.3133/tm2A13

Mugnai, F., Meglecz, E., CoMBoMed group, Abbiati, M., Bavestrello, G., Bertasi, F. Bo, M., Capa, M., Chenuil, A., Colangelo, M. A., Clerck, O. D., Gutierrez, J. M., Lattanzi, L., Leduc, M., Martin, D., Matterson, K. O., Mikac, B., Plaisance, L., Ponti, M., Riesgo, A., Rossi, V., Turicchia, E., Waeschenbach, A., Wangensteen, O. S., Constantini, F. (2021) Are well-studied marine biodiversity hotspots still blackspots for animal barcoding? *Global Ecology and Conservation* **32**: e01909. doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01909

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., Gough, K. C. (2014) The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* **51**: 1450-1459. doi.org/10.1111/1365-2664.12306

Salter, I. (2018) Seasonal variability in the persistence of dissolved environmental DNA (eDNA) in a marine system: The role of microbial nutrient limitation. *PLoS ONE* **13(2)**: e0192409. doi.org/10.1371/journal.pone.0192409

Thomsen, P. F., Willerslev, E. (2015) Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* **183**: 4-18. doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019

Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Moller, P. R., Rasmussen, M., Willerslev, E. (2012) Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE* **7(8)**: e41732. doi:10.1371/journal.pone.0041732.g001

Yoccoz, N. G. (2012) The future of environmental DNA in ecology. *Molecular ecology* **21**: 2031-2038. doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05505.x

Zangaro, F., Saccomanno, B., Tzafesta, E., Bozzeda, F., Specchia, V., Pinna, M. (2021) Current limitations and future prospects of detection and biomonitoring of NIS in the Mediterranean Sea through environmental DNA. *NeoBiota* **70**: 151-165. doi.org/10.3897/neobiota.70.71862

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13. svibnja 2000. godine u gradu Zadru u Republici Hrvatskoj. Osnovne škole koje sam pohađala su Privatna osnovna škola Nova (2007. do 2011.) i Osnovna škola Šime Budinića (2011. do 2015.), a Gimnaziju Franje Petrića sam pohađala od 2015. do 2019. Redovan sam student 3. godine preddiplomskog smjera Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovala sam u Noći muzeja 2020. godine kao volonter u Hrvatskom prirodoslovnom muzeju te sam odradila laboratorijsku stručnu praksu u herbarijskoj zbirci, Herbarium Croaticum, 2021. godine.