

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Najla Kajtezović
Bioraznolikost praživotinja (Protozoa) u špilji Veternica

Zagreb, 2012.

Ovaj rad izrađen je na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka (Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu) pod vodstvom doc.dr.sc. Renate Matoničkin Kepčija i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011/2012.

Sadržaj rada

1.	Uvod.....	1
	1.1.Praživotinje u podzemnim staništima	1
	1.2.Obilježja podzemnih staništa.....	4
2.	Ciljevi istraživanja.....	5
3.	Opis staništa i mikrostanšta.....	5
4.	Materijali i metode.....	11
5.	Rezultati.....	14
	5.1. Obilježja mikroklike i vlažnost mikrostanšta u špilji Veternica.....	14
	5.2. Bioraznolikost na istraživanim mikrostanštima.....	17
6.	Rasprava.....	30
7.	Zaključak.....	37
8.	Zahvale.....	38
9.	Literatura.....	39
10.	Sažetak.....	43
11.	Summary.....	44

1. Uvod

1.1. Praživotinje u podzemnim staništima

Praživotinje (Protozoa) su eukariotski jednostanični mikroskopski organizmi (veličina od 2 do 4500 μm). Filogenetski ne spadaju među životinje već su posebna polifiletska skupina organizama u koju ubrajamo skupine pokretnih fagotrofnih oblika jednostaničnih eukariota. Prema recentnoj sistematici viših kategorija (Adl i sur. 2005) pojedine skupine praživotinja nalazimo u pet (od šest ukupno) klastera. Nalazimo ih u brojnim vodenim i vlažnim staništima: mora, rijeke, jezera, tlo itd. Kozmopolitske su rasprostranjenosti i do sada je zabilježeno preko 85 000 vrsta. Većina praživotinja su bakteriovori, a neke krupnije vrste se hrane i drugim praživotinjama, mikrogljivama ili algama (u fotičkim sustavima). Neke vrste su detrivori, dok su mnoge prilagođene nametničkom načinu života. Jako dobro su prilagođene na povremene nestašice hrane i vode tako da u nepovoljnim uvjetima prelaze u stadij ciste. Kada ponovo nastupe povoljni uvjeti, iz ciste se razvije aktivni stadij praživotinje. Bioraznolikost praživotinja koje se nalaze u obliku cisti naziva se kriptična bioraznolikost, a bioraznolikost praživotinja koje se nalaze u aktivnom stadiju naziva se aktivna bioraznolikost (Hausmann i sur. 2003).

Praživotinje u krškim podzemnim staništima prvi put su zabilježene još u 19. stoljeću (Vandel 1965), no postoji jako malo podataka o njihovoj bioraznolikosti i ekologiji. Razlog tome leži u nizu metodoloških problema kao što su: mala gustoća populacija praživotinja u špiljama, nedostatna mikroskopska oprema i mali broj α -taksonoma za tako raznoliku skupinu organizama. Praživotinje uglavnom nisu sistematski proučavane u špiljama, već se uglavnom spominju samo popisi zabilježenih svojti, često samo do viših sistematskih kategorija i uz nedostatne informacija o staništima s kojih su uzorkovane, fizikalnim parametrima, fizičkim karakteristikama podzemnog staništa, itd. Većina literature o praživotinjama u podzemnim staništima je teško dostupna i ne nudi dovoljno reprezentativnih informacija (Golemansky i Bonett 1994; Sigala-Regalado i sur. 2011; Vandel 1965).

Budući da se praživotinje u špiljama (s izuzetkom staništa sa šišmišjim guanom) nalaze u malobrojnim populacijama, mnogi autori su proučavali praživotinje tako da su ih uzgajali u umjetnim hranjivim podlogama. Na taj način se ne može dobiti prava slika o bioraznolikosti praživotinja u špiljama, jer dolazi do razvoja i onih praživotinja koje su se nalazile u obliku cisti (kriptična raznolikost), dok je moguće da se neke vrste iz aktivne

bioraznolikosti neće moći razviti u kulturi. Također, uzgojem u hranjivim podlogama nije moguće dobiti informacije o brojnosti pojedinih svojti (Foissner 2006; Walochnik i Mulec 2009).

Praživotinje su zabilježene u mnogim podzemnim krškim staništima po cijelom svijetu, od kopnenih špilja i jama, anihalinim i morskih špilja, pa sve do špiljskih dijelova cenota (Golemansky i Bonett 1994; Hill i sur.1986; Van Hengstum i sur. 2009; Van Hengstum i Scott 2011). Pojavljuju se na velikom broju staništa i mikrostanšta kao što su: podzemna jezera i rijeke, špiljski sedimenti, kalcitne splavi, špiljsko mlijeko, stalaktiti, stalagmiti, lokve u glini, šišmišji guano, zidovi špilja, a mnoge su nametnici ili epizoobionti na špiljskim životinjama (Bastian i sur. 2009; Coppellotti i Guidolin 1999; Golemansky i Bonett 1994; Sigala-Regalado i sur. 2011; Vandel 1965; Walochnik i Mulec 2009).

Većina praživotinja zabilježena u krškim podzemnim staništima već je opisana na nekom od nadzemnih staništa (vode, tlo), no među zabilježenim vrstama neke su prvi put opisane i do sada zabilježene jedino u špiljama (npr. *Allovahlkampfia spelaea*, *Diafolliculina hadzii*)(Dovgal i Vargovitsh 2010; Mulec 2008; Walochnik i Mulec 2009).

Najviše svojti zabilježeno je među slobodnoživućim praživotinjama. Zabilježeni su rodovi trepetljikaša: *Paramecium*, *Colpoda*, *Colpidium*, *Cyclidium*, *Acineta*, *Tetrahymena*, *Amphyleptus*, *Lacrymaria*, *Dileptus*, *Litonotus*, *Trachelophyllum*, *Loxodes*, *Chilodonella*, *Pseudochilodonopsis*, *Trochilia*, *Glaucoma*, *Cinetochilum*, *Philasterides*, *Uronema*, *Halteria*, *Stylonichia*, *Euplotes*, *Spirostomum*, *Discomorphella*, *Epalxella*, *Brachonella*, *Metopus*, *Strobilidium*, *Aspidisca*, *Holosticha*, *Oxytricha*, *Sterkiella*. Među trepetljikašima je zabilježeno i više vrsta sesilnog roda *Vorticella*. Okučene amebe zastupljene su rodovima: *Arcella*, *Cyphoderia*, *Trinema*, *Cyclopyxis*, *Centropyxis*, *Euglypha*, *Diffflugia*, *Tracheleuglypha*, *Cryptodiffflugia*, *Plagiopyxis*, *Phryganella*, *Nebela*, *Pontigulasia*, *Sphenoderia*, *Heleopera* i *Placocysta*, a od golih ameba zabilježeni su rodovi: *Acanthamoeba*, *Hartmanella*, *Mayorella*, *Vannella*, *Vexillifera*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Allovahlkampfia*, *Nuclearia*, *Echinamoeba*, *Pleomyxa* i *Amoeba*. Sunašca su zastupljena s pet rodova: *Actinophrys*, *Hetrophrys*, *Acanthocystis*, *Raphidiophrys* i *Actinosphaerium*. Bičaši su zastupljeni rodovima: *Bodo*, *Cercobodo*, *Chilomonas*, *Monas*, *Oicomonas*, *Mastigamoeba*, *Spiromonas*, *Tetramitus*, *Peranema*, *Scytomonas*, *Astasia*, *Anisonema*, *Entosiphon*, *Bicosoeca*, *Monosiga*, *Cephalothamnium*, *Rynchomonas*, *Cercomonas* i *Polytoma*. Krednjaci su zabilježeni samo u anihalinim i morskim špiljama i zastupljeni su velikim brojem rodova: *Borovina*, *Bolivina*, *Amonia*, *Rosalina*, *Helenina* i mnoge druge (Bastian i sur. 2009;

Coppellotti i Guidolin 1999; Golemansky i Bonett 1994; Sigala-Regalado i sur. 2011; Vandel 1965; Walochnik i Mulec 2009).

Epizoičke praživotinje u podzemnim staništima uglavnom nisu sustavno istraživane, već su sporadično opisivane tijekom istraživanja njihovih domaćina. Radi se o različitim sesilnim trepetljikašima koji su zabilježeni na deseteronožnim i izopodnim rakovima, rakušcima, ličinkama kukaca i mnogočetinašu *Marifugia cavatica*. Do sada su zabilježeni trepetljikaši rodova: *Spelaeophyra*, *Tokophrya*, *Diafolliculina*, *Gymnodinioides*, *Echinophrya*, *Lagenophrys*, *Scyphidia*, *Vaginicola*, *Platicola*, *Vorticella* i *Epistyllis*. Smatra se da ovi trepetljikaši nisu u parazitskom već u komenzalskom odnosu u kojem praživotinje, zbog konstantnog kretanja domaćina, imaju dostupniju hranu i lakše se rasprostranjuju. Neki autori smatraju da se pojedine epizoičke praživotinje (npr. *Spelaeophyra troglocaridis*) jedine mogu smatrati pravim podzemnim praživotinjama, tj. stigobiontima, no mnoge od njih (npr. rodovi *Vorticella*, *Epistyllis*) zabilježene su i u nadzemnim staništima (Culver i Sket 2000; Dovgal i Vargovitsh 2010; Golemansky i Bonett 1994; Matjašič 1962).

Nametničke praživotinje u podzemnim staništima su također zabilježene tijekom proučavanja njihovih domaćina. Radi se o truskovcima (Sporozoa) koji su zabilježeni u domaćinima kao što su: čovječja ribica, rakovi, stonoge i kukci. Zabilježeni su rodovi: *Chloromyxum*, *Bulgarosoma* i *Serboiulus* (Golemansky i Bonett 1994). Veliki broj nametničkih bičša (npr. *Plasmodium*, *Nycteria*, *Trypanosoma*, *Schizotripanum*) zabilježen je u šišmiša, dok su nametnički trepetljikaši (npr. *Anoplophrya*) zabilježeni u rakušaca i maločetinaša (Vandel 1965).

U kontekstu kontaminacije podzemnih voda spominju se nametničke vrste *Cryptosporidium parvum* i *Giardia lamblia*, koje mogu doći u podzemlje fekalnim zagađenjem s površine. Zbog stabilnih uvjeta koji vladaju u podzemlju njihove ciste ostaju vijabilne puno dulje nego što bi to bilo na površini, te stoga podzemlje ostaje kontaminirano i nakon što prestane površinska emisija cisti (Culver i White 2005; Gunn 2004; Harvey i sur. 2008). Novija istraživanja praživotinja u podzemnim staništima usmjerena su na proučavanje potencijala praživotinja kao bioindikatora kvalitete krških podzemnih voda (Coppellotti i Guidolin 1999, 2002).

Praživotinje podzemnih staništa u Republici Hrvatskoj su potpuno neistražene. Preliminarno su istražena samo četiri speleološka lokaliteta dinarskog krša: dvije špilje (Kotluša i Šipun) i dvije jame (Muda labudova i Frkina jama). U uzorcima iz špilja pronađeno je četrnaest različitih vrsta praživotinja iz nekoliko sistematskih kategorija, dok u

uzorcima iz jama nisu zabilježene praživotinje (Kajtezović 2011). Praživotinje u špilji Veternica nikada nisu istraživane.

1.2. Obilježja podzemnih staništa

Podzemna staništa su, zajedno s morskim dubinama, među najmanje istraženim područjima na Zemlji. Glavna karakteristika im je odsustvo svjetlosti i oligotrofija zbog odsustva fotoautotrofnih primarnih producenata. Primarna *in situ* produkcija organske tvari koju vrše kemoautotrofne bakterije je gotovo zanemariva, tako da većina hranjivih tvari dolazi perkolacijom organskih tvari s površine kroz epikršku zonu. U špiljama u kojima konstantno ili periodično borave šišmiši, guano je dominantan izvor energije u ulaznim dijelovima. Posredstvom hranidbenih mreža, ta energija se prenosi i u dublje dijelove špilje. Važan izvor energije predstavljaju i lešine, izmet i urin organizama u podzemnim staništima. Bitan dio organskih tvari ulazi u podzemna staništa egzogenim tekućicama, a nešto manje i zračnim strujama koje cirkuliraju kroz špilje. Količina, kvaliteta i podrijetlo organske tvari jako varira ovisno o karakteristikama pojedinog podzemnog objekta (veličina ulaza, prisutnost egzogenih tekućica, duljina i dubina objekta itd.) i njegovom okruženju (zajednice nadzemnih organizama i njihove karakteristike itd.) (Culver i Pipan 2009; Gottstein Matočec i sur. 2002).

Glavno obilježje mikroklima špilja je stabilnost. Temperatura zraka u podzemnim staništima, kako idemo od ulaza špilje prema njenoj unutrašnjosti, približava se prosječnoj godišnjoj temperaturi područja u kojem se nalazi. Dubina do koje će se osjećati vanjski utjecaji ovisi o morfologiji, veličini i hidrologiji objekata, a osobito bitan faktor predstavlja strujanje zraka kroz špilju. Vlažnost zraka u špiljama je jako visoka i stabilna zahvaljujući konstantnom procjeđivanju vode kroz epikršku zonu (Culver i Pipan 2009; Gottstein Matočec i sur. 2002).

Podzemni ekosustavi, u usporedbi s površinskim, nemaju veliki broj staništa zbog svog ograničenog prostora i relativno homogene građe. Dijeli ih se na kopnena, vodena i prijelazna staništa. Kopnena staništa čine zidovi i stropovi podzemnih objekata, te različite vrste podova (dna) špilje koji mogu biti građeni od čiste matične stijene ili prekriveni nanesenim materijalom (npr. glina, pijesak, valutice, komadi vegetacije ili humusa u ulaznim dijelovima objekata, nakupine guana itd.). Vodena staništa se dijele na tekućice (rijeke i potoci), stajačice (jezera) i manje vodene prostore kao što su lokve u glini i kamenice.

Prijelazna staništa čine špiljski higropetrik (stijene preko kojih se laminarno u tankom sloju prelijeva voda koja nikada ne presušuje) i prostori između vapnenačkih cjevčica mnogočetinaša *Marifugia cavatica* (koji povremeno presušuju) (Culver i Pipan 2009; Gottstein Matočec i sur. 2002; Sket 2004).

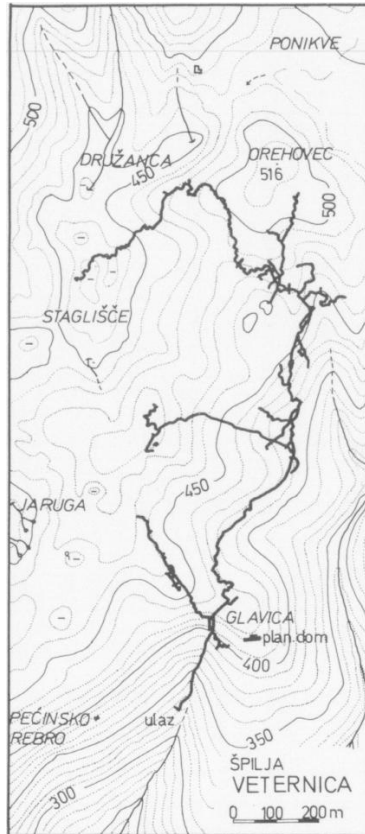
2. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja u špilji Veternica su:

- a) odrediti bioraznolikost praživotinja i prostorno-vremenski sastav njihovih zajednica u šestomjesečnom razdoblju,
- b) odrediti na kojim mikrostaništima se pojavljuju praživotinje i postoji li razlika u bioraznolikosti praživotinja između mikrostaništa,
- c) istražiti kakav je utjecaj količine guana na sastav zajednica i brojnost praživotinja,
- d) praćenjem hidrometeoroloških parametara izvan špilje i mikroklimatskih parametara unutar špilje istražiti koji ključni čimbenici i na koji način utječu na populacije praživotinja u špilji Veternica i
- e) zabilježiti pojavljuju li se na istraživanim mikrostaništima još neki organizmi.

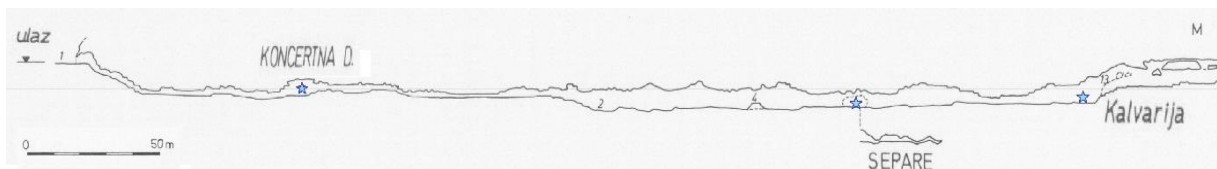
3. Opis staništa i mikrostaništa

Špilja Veternica nalazi se u sklopu jugozapadnog dijela Parka prirode Medvednica (5077,760 N, 5568,240 E) na 330 m nadmorske visine (Slika 1). Godine 1979. zaštićena je kao geomorfološki spomenik prirode. Svojom duljinom od 7128 m šesta je po dužini u Hrvatskoj, a visinska razlika u špilji iznosi preko 200 m. Nalazi se u izoliranom (osamljenom) kršu. Građena je od litotamnijskog vapnenaca i dolomita, a nastala je tijekom pleistocena. Prvih 380 m špilje je turistički uređeno i godišnje primi veliki broj posjetioca (Gottstein Matočec i sur. 2002; Ozimec i sur. 2003).



Slika 1. Topografska karta jugozapadnog dijela Medvednice s tlocrtom špilje Veternica (Preoblikovano prema Čepelak 1978-1979).

Uzorkovanje je provedeno u špilji Veternica, na udaljenosti od 90 do 380 metara od ulaza na tri lokacije: Koncertna dvorana, Kalvarija i Separe (Slika 2). Proučavana su prijelazna špiljska staništa (saljev i higropetrik) i vodena špiljska staništa (lokve u glini). Mikrostanista na kojima je izvršeno uzorkovanje su: mikrokamenice, lokve u glini i higropetrik.



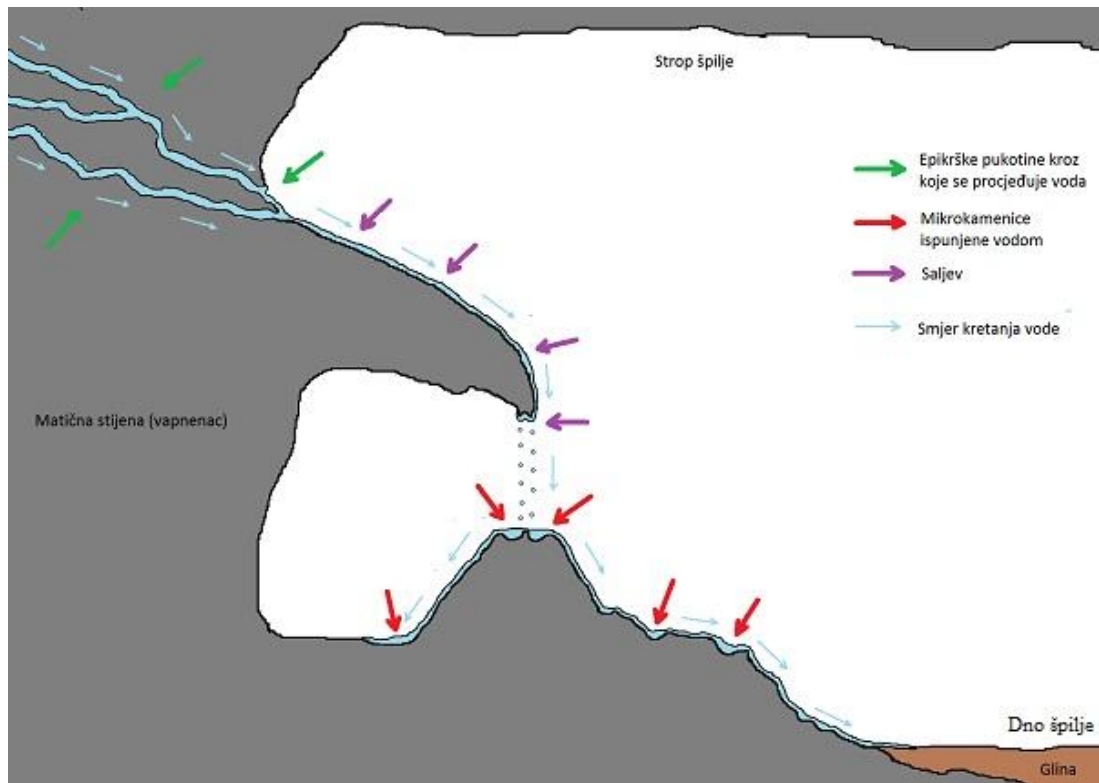
Slika 2. Isječak dijela profila topografskog nacrtu špilje Veternica u kojem je obavljeno uzorkovanje; zvjezdicama su označene lokacije istraživanja (Preoblikovano prema Čepelak 1978-1979).

U Koncertnoj dvorani (90 m od ulaza u špilju) proučavana su mikrostaništa na hidrološki djelomično aktivnom saljevu, koji s obzirom na ograničenu količinu vode, spada u prijelazno špiljsko stanište (Gottstein Matočec i sur. 2002). Saljev (Slika 3 i 4) je vrsta sige koja nastaje kada se voda u tankom sloju prelijeva preko široke površine pri čemu iz vodene otopine izlazi CO₂ i dolazi do kristalizacije kalcita koji se taloži u obliku tankih slojeva. Kako se voda prelijeva i pod utjecajem gravitacije kreće prema dnu špilje, tako dolazi do postepenog rasta saljeva pri čemu može doći do spajanja njegovog gornjeg (stalaktitnog) dijela sa dnom špilje (Lacković 2003).

Procjedna voda se cijedi iz pukotina epikrške zone iznad samog saljeva i prelijeva se preko njegovog stalaktitnog dijela, te pod utjecajem gravitacije slobodno pada u obliku kapljica na stalagmitni segment saljeva (Slika 3). Brzina procjeđivanja vode, njen volumen i broj mjesta s kojih kaplje mijenja se ovisno o hidrometeorološkim uvjetima koji vladaju iznad špilje. Trenutno su u Koncertnoj dvorani hidrološki aktivne samo dvije odvojene zone preko kojih se procjeđuje voda.

Stalagmitni segment saljeva u Koncertnoj dvorani nije potpuno gladak već je prekriven mikrostrukturnim reljefom koji nastaje precipitacijom kalcita iz vodene otopine pri čemu se stvaraju mikrostrukture u obliku malih udubina, nabora i mikrokamenica u kojima se zadržavaju voda i guano. Nabori su veliki svega par milimetara, mnogobrojni su i poslagani u kaskadnim koncentričnim nizovima, dok su udubine i mikrokamenice širine i dubine do dva centimetra i puno su malobrojnije. Mikrokamenice i udubine na desnom dijelu saljeva nemaju sediment na dnu, dok mikrokamenice i udubine na lijevom dijelu saljeva na dnu imaju nataloženu glinu koja je dotekla posredstvom procjedne vode iz epikrške zone.

Na saljevu u Koncertnoj dvorani proučavano je mikrostanište koje čine male udubine i mikrokamenice ispunjene vodom na stalagmitnom dijelu saljeva. Ove udubine su različitog postanka, no funkcionalno su jako slične pa će ih se, radi lakšeg praćenja, u nastavku rada skupno nazivati mikrokamenicama. Proučavane su mikrokamenice s dnom ispunjenim glinom (MK-1) koje se nalaze na lijevoj strani stalagmitnog dijela saljeva i mikrokamenice s dnom koje nije ispunjeno sedimentom već se sastoji od čiste matične stijene, tj. od kalcita (MK-2) i nalazi se na desnom dijelu stalagmitnog segmenta saljeva (Slika 4).



Slika 3. Saljev u Koncertnoj dvorani (Crtež: Najla Kajtezović).

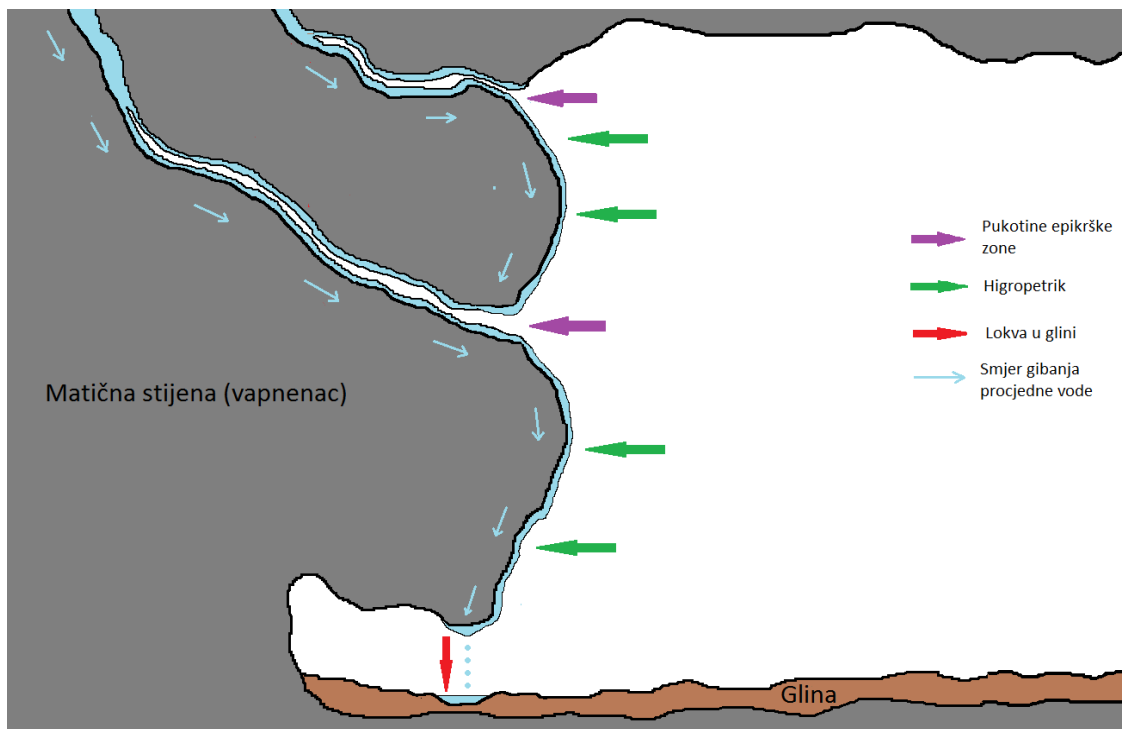


Slika 4. Saljev u Koncertnoj dvorani s pozicijom mikrostaništa mikrokamenice 1 (MK-1) i mikrokamenice 2 (MK-2) (Fotografija: Denis Kovačić).

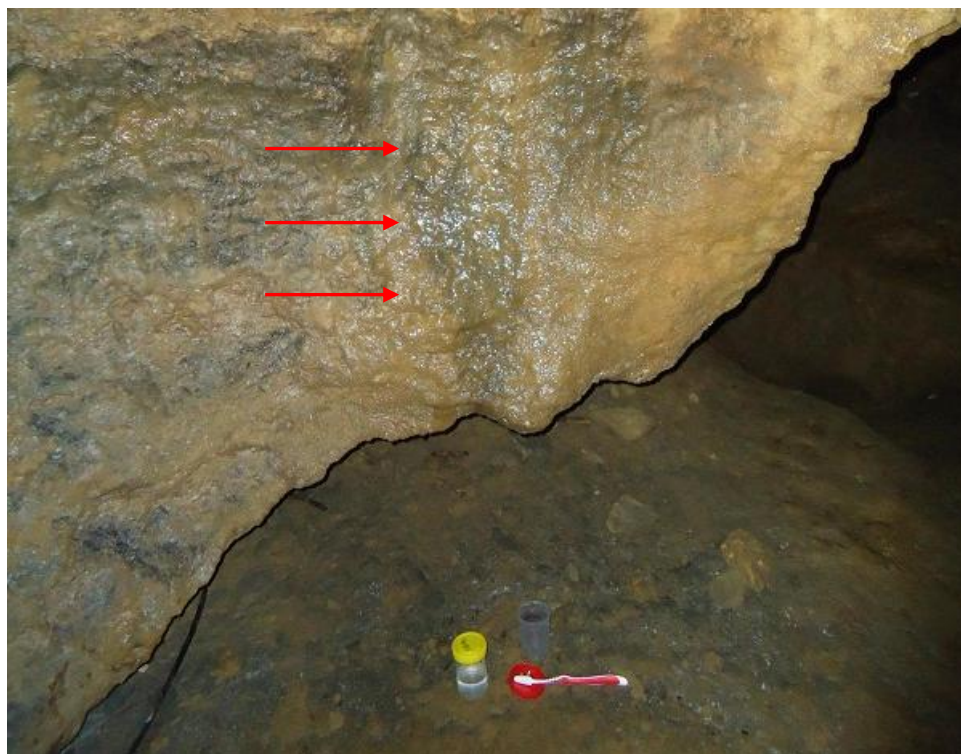
Separe je lokacija koja je 257 metara udaljena od ulaza u špilju i čini ju kružna dvorana koja je s ostatkom špilje povezana kratkim prokopanim kanalom. U njoj se nalaze dva tipa staništa: vodena staništa (lokve u glini) i prijelazna staništa (higropetrik). Osnovno obilježje Separea je velika količina gline koja se sporadično nalazi po zidovima špilje i njenom podu. Uzrok takve raspodjele gline je u restauracijskom postupku obavljenom pod nadzorom Parka prirode Medvednica, pri kojem su neki zidovi obloženi slojem autohtone gline, čime su se prekrili zidovi špilje koji su oštećeni kao posljedica vandalizma (urezivanje u zidove, farbanje, grafiti). Na taj se način izbjeglo korištenje agresivnih kemijskih sredstava, kao i bilo kakvo unošenje alohtonih materijala u špilju čime je očuvana njena cjelovitost. Jedan dio gline je tijekom godina ispran ili djelomično kalcificiran, dok su neki dijelovi po kojima nema toka vode (suhi zidovi) još uvijek prekriveni slojem gline.

Lokve u glini (LG-S) u Separeu su vodeni tip mikrostaništa (Gottstein Matočec i sur. 2002), a nastaju kada se voda sa higropetrika i siga procjeđuje i pada na glinu (Slika 5). Neke lokve su potpuno u glini, dok su druge djelomično produbljene do stijenske podloge, no glina je i dalje dominantan element koji određuje ovo mikrostanište.

Higropetrik u Separeu je prijelazni tip mikrostaništa koje čini stijena preko koje se laminarno prelijeva voda koja nikad ne presušuje, čime takva voda čini konstantan film preko stijene (Slika 5). U Separeu postoji više zidova preko kojih se sporo prelijeva voda. Unatoč maloj udaljenosti, postoje razlike u obliku kristalizacije između različitih dijelova zidova (Slika 6). Sloj vode je tanak tako da nije vidljivo tečenje, ali se ono očituje preko konstantnog sporog kapanja vode sa stijene i činjenice da ovo stanište nije presušilo tijekom cjelokupnog šestomjesečnog razdoblja istraživanja. Istražena su dva higropetrika s odvojenim izvorom vode: higropetrik 1 (HP-1) i higropetrik 2 (HP-2).



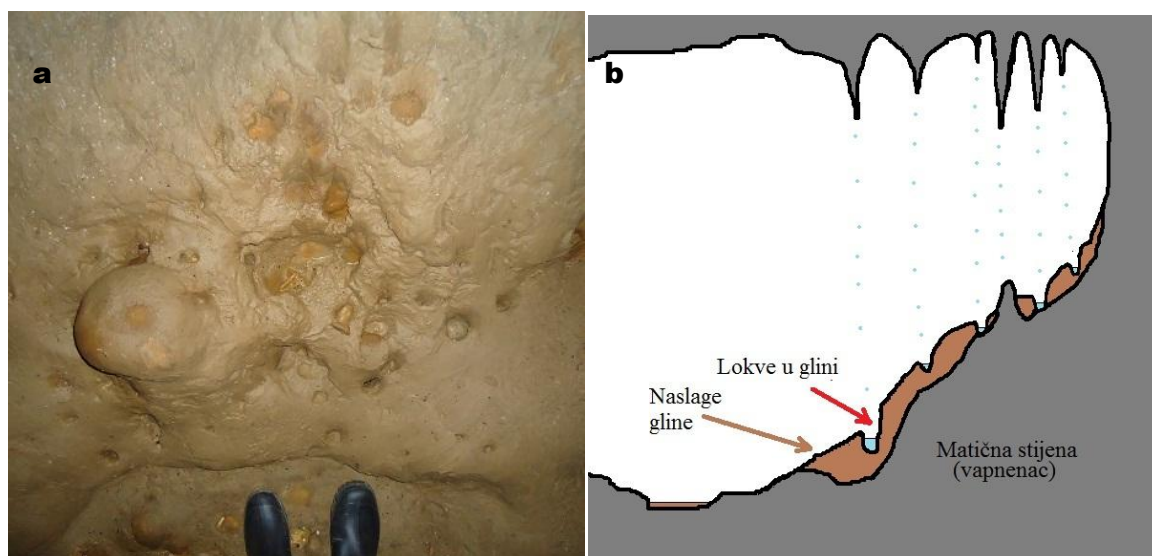
Slika 5. Shematski prikaz mikrostaništa u Separeu (Crtež: Najla Kajtezović).



Slika 6. Higropetrik u Separeu (Fotografija: Najla Kajtezović).

Lokacija Kalvarija je 380 m udaljena od ulaza i hidrološki je aktivna. Sastoji se od dvorane s visokim stropom sa stalaktitima s kojih se voda procjeđuje u naslage gline tvoreći

mikrostanište malih lokvi u glini (LG-K). Neke od tih lokvi su isprane do matične stijene, no glina ostaje kao dominantan element koji određuje ovo mikrostanište (Slika 7).



Slika 7. Lokve u glini oblikovane kapanjem vode sa stalaktita u Kalvariji (a); presjek kroz lokve u glini nastali kapanjem vode sa stalaktita u Kalvariji (b) (Fotografija i crtež: Najla Kajtezović).

4. Materijali i metode

Osnovno obilježje svih istraživanih staništa i mikrostaništa u Veternici je njihova mala veličina i ograničena količina vode. Kako bi se povećala učinkovitost uzorkovanja korištena je dodatna sterilna voda koja po svom kemijskom sastavu odgovara izvorskoj vodi (Tablica 1). Ovakav kemijski sastav otopljenih tvari u vodi nužan je kako bi se umanjila mogućnost osmotskog šoka i posljedičnog ugibanja organizama.

Tablica 1. Kemijski sastav dodatne vode korištene za uzorkovanje.

Kemijski sastav (mg/l)			
Kationi		Anioni	
Natrij (Na^+)	11,60	Fluoridi (F^-)	0,25
Kalij (K^+)	1,20	Kloridi (Cl^-)	3,60
Magnezij (Mg^{2+})	26,80	Hidrogenkarbonati (HCO_3^-)	416,00
Kalcij (Ca^{2+})	85,80	Sulfati (SO_4^{2-})	3,27
Mineralizacija	571,35	Isparni ostatak (na 180°C)	344,60

Istraživanje je trajalo šest mjeseci i bilo je podijeljeno na dva tromjesječja: od listopada do prosinca 2011. godine i od veljače do travnja 2012. Uzorkovanje u siječnju 2012. godine nije obavljeno zbog isteka dozvole Ministarstva kulture za istraživanje u Veternici. Mjesečno je uzet samo po jedan uzorak sa svakog mikrostaništa. Mikroklimatske karakteristike u špilji praćene su tijekom sedam mjeseci: od listopada 2011. do travnja 2012. godine.

Voda iz mikrokamenica u Koncertnoj dvorani uzorkovana je plastičnom kapalicom (Slika 8 a i b) u kombinaciji sa sintetičkom četkicom. Sadržaj mikrokamenice se prvo usiše s kapalicom i prenese u plastičnu bočicu zapremine 120 ml. Ostatak guana u mikrokamenici prenosi se u bočicu pomoću sintetičke četkice. Potom se prazna mikrokamenica ispiru sterilnom vodom koja se zatim prebacuje u bočicu s uzorkom.

Voda iz lokvi u glini u Kalvariji i Separeu uzorkovana je plastičnom kapalicom tako da je, osim vode, usisan i guano ako se nalazio u vodi (Slika 8 c).



Slika 8. Uzorkovanje vode iz mikrokamenica s kalcitnim dnom (a), uzorkovanje vode iz mikrokamenica s dnom ispunjenim glinom (b) i uzorkovanje vode iz lokve u glini u Separeu (c) (Fotografije: Denis Kovačić).

Zajednice organizama s higropetrika uzorkovane su pomoću sintetičke četkice (Slika 9) koja se potom ispirala u 40 ml sterilne vode koja se nalazila u plastičnoj bočici zapremine 120 ml. Na taj način se uzorkuju zajednice organizama koji se nalaze u tankom filmu vode koja se prelijeva preko stijena (higropetrik). Postupak se ponavlja dok se voda u bočici ne zamuti.



Slika 9. Uzorkovanje higropetrika (Fotografija: Denis Kovačić).

Uzorci su čuvani na temperaturi od 4 do 10 °C i pregledani unutar 48 h pomoću svjetlosnog mikroskopa Carl Zeiss Primo Star, uz korištenje faznog kontrasta i boja za mikroskopiju (šafrenin i metilno zelenilo). Pregledano je ukupno 0,6 ml svakog uzorka prilikom čega je zabilježena bioraznolikost i brojnost vrsta, a determinacija je izvršena pomoću ključeva: Kahl 1930-35, Foissner i sur. 1991, 1992, 1994, 1995, Foissner i Berger 1996, Ogden i Hedley 1980, Streble i Krauter 1973. Prilikom određivanja bioraznolikosti i brojnosti okućenih ameba uzimane su u obzir i prazne ljušturice. Zbog nemogućnosti reprezentativnog uzorkovanja sa proučavanih mikrostaništa u ovom radu neće biti izloženi rezultati o apsolutnoj brojnosti praživotinja, tj. njihovo preračunavanje na određeni volumen uzorka već će se razmatrati općenito bioraznolikost praživotinja s kratkim osvrtima na gustoću populacija.

Podaci su analizirani u programu Primer 6 za izračunavanje Bray-Curtisovog indeksa sličnosti i Cluster analizu, dok su ostali proračuni napravljeni u programu Microsoft Office Excel.

Fotografije praživotinja i mikrometazoa snimljene su fotoaparatom Canon EOS 40D na povećanjima od 4 do 100 puta, dok su fotografije mikrostaništa snimljene fotoaparatom Sony DSC-W320. Crteži su napravljeni u programu Microsoft Paint.

Temperatura, vlažnost i strujanje zraka na ulazu u špilju i unutar nje mjereni su s termohigroanemometrom Kestrel 3000. Podaci o prosječnoj dnevnoj vanjskoj temperaturi, relativnoj dnevnoj vlazi i dnevnim oborinama sa meteorološke postaje Zagreb-Grič dobiveni su od Državnog hidrometeorološkog zavoda. Ova postaja je odabrana zbog male razlike u nadmorskoj visini i male udaljenosti od špilje Veternica. Podaci o temperaturi, vlažnosti i strujanju zraka u Veternici za siječanj 2012. godine dobiveni su od Petre Žvorc (Hrvatsko biospeleološko društvo, monitoring populacije šišmiša).

Količina guana procijenjena je na osnovu prisustva skeletnih ostataka kukaca i ostataka krilnih ljuščica leptira (squame) prilikom mikroskopskog pregledavanja tri puta po 0,2 ml uzorka na povećanju od 10 puta. Podijeljena je na kategorije od 0 do 3 koje označavaju:

- 0 – potpuno odsustvo tragova guana,
- 1 – prisustvo svega par krilnih ljuščica (squama) ili ostataka skeleta kukaca,
- 2 – prisutna veća količina krilnih ljuščica (squama) i ostataka skeleta kukaca i
- 3 – prisutna velika količina krilnih ljuščica (squama) i ostataka skeleta kukaca.

Vlažnost mikrostaništa procijenjena je na osnovu minimalnog i maksimalnog raspona moguće količine vode, a procjena je izvršena na osnovu fotografija mikrostaništa i okularnih metoda prema ocjenskoj skali:

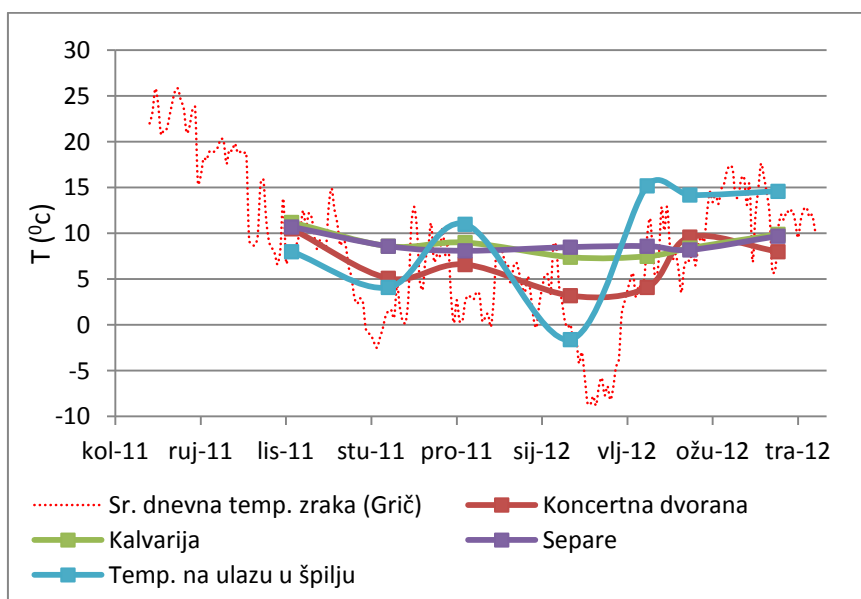
- 0 - mikrostanište potpuno presušilo (0% slobodne vode),
- 1 - mikrostanište s <20% od maksimalno moguće vode na mikrostaništu,
- 2 - mikrostanište s 21-40% od maksimalno moguće vode na mikrostaništu,
- 3 - mikrostanište s 41-60% od maksimalno moguće vode na mikrostaništu,
- 4 - mikrostanište s 61-80% od maksimalno moguće vode na mikrostaništu i
- 5 - mikrostanište s 81-100% od maksimalno moguće vode na mikrostaništu.

5. Rezultati

5.1. Obilježja mikroklimе i vlažnost mikrostaništa u špilji Veternica

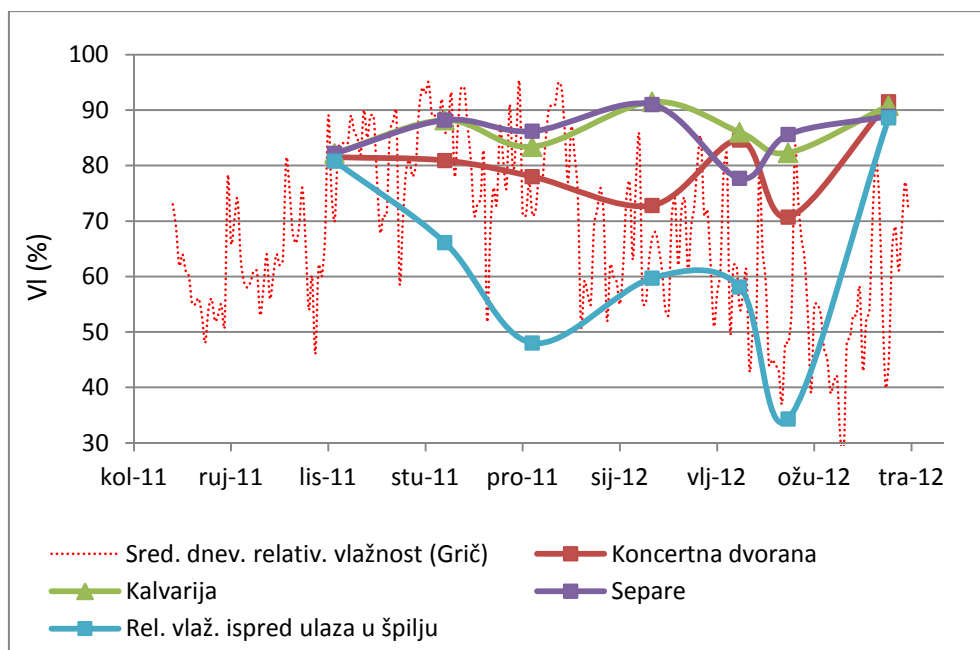
Strujanje zraka unutar špilje tijekom sedmomjesečnog razdoblja nije zabilježeno. Jedino je zabilježeno strujanje zraka ispred ulaza u špilju s maksimumom od 4 km/h (ožujak 2012.), ali ono se nije moglo povezati s cirkulacijom zraka vezanom uz špilju.

Temperatura u špilji Veternica nije pokazivala velika odstupanja (Slika 10). Najmanje varijacije u temperaturi bile su na postajama Kalvarija i Separe. Maksimalna zabilježena temperatura u Kalvariji bila je 11,2°C (listopad 2011.), a minimalna 7,4°C (veljača 2012.), dok je amplituda iznosila 3,8°C. U Separeu je maksimalna temperatura iznosila 10,7°C (listopad 2011.), a minimalna 8,1°C (prosinac 2011.), dok je amplituda iznosila 2,6°C. Iz ovih podataka se može zaključiti da je temperatura na postaji Separe malo stabilnija od one u Kalvariji. Temperatura u Koncertnoj dvorani je pokazivala puno veće amplitude u odnosu na ostale postaje i puno je više bila pod utjecajem temperature izvan špilje. Kretala se od 10,5°C (listopad 2011.) do 3,2°C (siječanj 2012.) što je raspon od 7,3°C. Međutim, ako se usporedi temperatura unutar špilje s prosječnim dnevnim temperaturama s meteorološke postaje Zagreb-Grič, vidljivo je da je temperatura unutar špilje modificirana u odnosu na vanjsku i puno je bliža prosječnoj godišnjoj temperaturi istraživanog područja koja, prema Klimatskom atlasu SFRJ (1931.-1960.) iznosi 8°C.



Slika 10. Usporedba srednjih dnevnih temperatura s meteorološke postaje Zagreb-Grič s izmjerenim temperaturama u špilji.

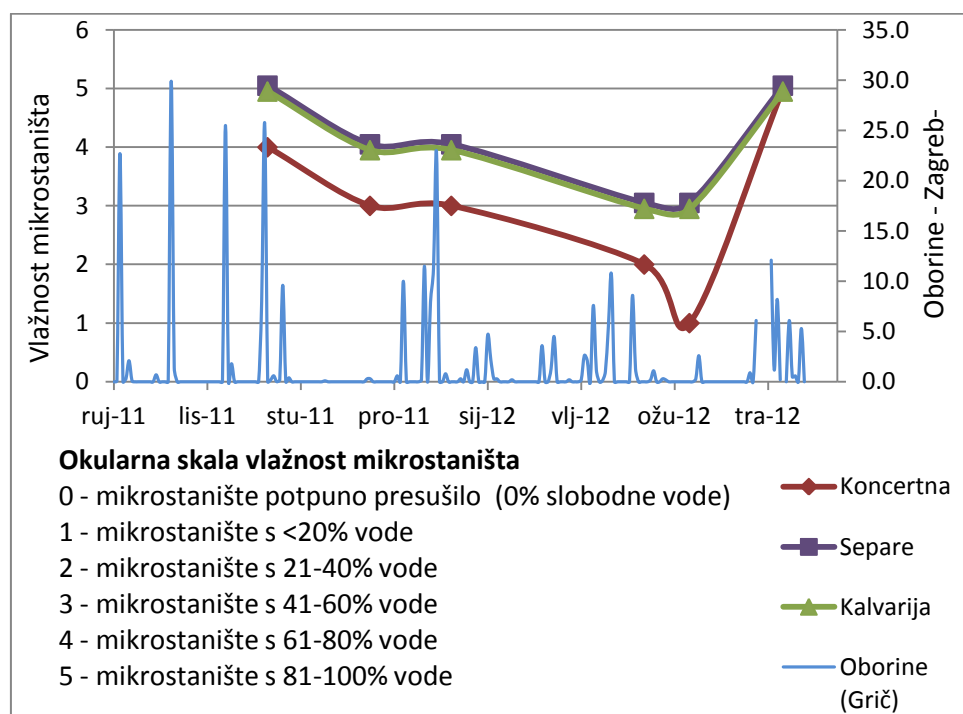
Usporedbom relativne vlažnosti zraka u špilji tijekom sedam mjeseci (Slika 11) može se pratiti jednak trend kao za temperaturu – relativna vlažnost zraka pokazuje najmanje varijacije na postajama Kalvarija i Separe. Maksimalna zabilježena relativna vlažnost zraka u Kalvariji bila je 91,5% (siječanj 2012.), a minimalna 82,2% (listopad 2011.), a amplituda je iznosila samo 9,3%. Slično je bilo na postaji Separe gdje je maksimalna relativna vlažnost zraka iznosila 91% (siječanj 2012.), a minimalna 77,7% (veljača 2012.), dok je amplituda iznosila 13,3%. Iz toga se zaključuje da je relativna vlažnost zraka nešto stabilnija u Kalvariji u odnosu na Separe. Vlažnost zraka u Koncertnoj dvorani imala je puno veće amplitude. Maksimalna zabilježena vrijednost relativne vlažnosti zraka u Koncertnoj dvorani iznosila je 91,5% (travanj 2012.), a minimalna 70,7% (ožujak 2012.) s amplitudom od 20,8%. Usporedbom relativne vlažnosti zraka u Veternici s prosječnom vlažnošću zraka s meteorološke postaje Zagreb-Grič, vidljivo je da je u špilji relativna vlažnost zraka puno stabilnija i ne pokazuje ovisnost o vanjskoj vlažnosti zraka.



Slika 11. Usporedba srednje dnevne relativne vlažnosti zraka s meteorološke postaje Zagreb-Grič s relativnom vlažnošću zraka u špilji.

Usporedbom dnevne količine oborina s meteorološke postaje Zagreb-Grič i vlažnosti staništa (procijenjeno okularnom metodom) (Slika 12) vidljivo je da postoji korelacija između te dvije vrijednosti. Povećanje vlažnosti staništa događa se s malim zakašnjenjem u odnosu na oborine. Najveće oscilacije u vlažnosti staništa zabilježene su u Koncertnoj

dvorani. Nijedno mikrostanište nije u potpunosti presušilo tijekom šestomjesečnog praćenja unatoč maloj količini padalina.



Slika 12. Usporedba dnevne količine oborina s meteorološke postaje Zagreb-Grič i vlažnosti mikrostaništa koja su procijenjena okularnom metodom.

5.2. Bioraznolikost na istraživanim mikrostaništima

Nakon šest mjeseci istraživanja zabilježeno je ukupno četrdeset i sedam svojti praživotinja. Većina zabilježenih praživotinja manja je od 50 μm što je jako otežavalo njihovu determinaciju. Mikroskopiranje je bilo otežano zbog velike količine krilnih ljuščica i ostataka skeleta kukaca, te kristala kalcita i gline. Velika količina kalcita i gline je osobito zabilježena u uzorcima s higropetrika. Precizno do vrste je determinirano samo 17 svojti, a 15 svojti je determinirano do kategorije roda. Ostatak vrsta je determiniran do najniže moguće kategorije kako bi se naznačilo da se radi o različitim vrstama.

Prisutnost praživotinja potvrđena je na svim istraživanim mikrostaništima: mikrokamenicama s glinovitim dnom (MK-1), mikrokamenicama s kalcitnim dnom (MK-2), higropetriku 1 (HP-1) i higropetriku 2 (HP-2), te lokvama u glini u Separeu (LG-S) i lokvama u glini u Kalvariji (LG-K) (Tablice 2, 3 i 4). Izuzetak su bile jedino postaje higropetrik 2 u

prosincu 2011. godine i higropetrik 1 u veljači 2012. godine kada na njima nisu zabilježene praživotinje.

Tablica 2. Zabilježene svojte praživotinja tijekom šestomjesečnog istraživanja na mikrostaništima mikrokamenice 1 (MK-1) i mikrokamenice 2 (MK-2).

Okučene amebe	Sunašca	Trepetljikaši	Bičaći	Gole amebe
<i>Euglypha tuberculata</i>	<i>Actinophrys sol</i>	<i>Colpoda steinii</i>	Nanoflagellata sp. 1	<i>Vahlkampfia</i> sp. 1
<i>Euglypha rotunda</i>	<i>Oxnerella</i> sp.	<i>Cyclidium glaucoma</i>	Nanoflagellata sp. 2	<i>Vahlkampfia</i> sp. 2
<i>Euglypha laevis</i>	<i>Heterophrys</i> sp.	<i>Cinetochilum margaritaceum</i>	Nanoflagellata sp. 3	<i>Mayorella</i> sp. 1.
<i>Euglypha</i> sp.		<i>Litonotus lamella</i>	Nanoflagellata sp. 4	<i>Mayorella</i> sp. 2
<i>Tracheleuglypha dentata</i>		<i>Glaucoma</i> sp.	Nanoflagellata sp. 5	Amoebida sp. 1
<i>Diffflugia oblonga</i>		Nassulida sp. 1		Amoebida sp. 2.
<i>Diffflugia</i> sp.		Hymenostomata sp. 1		
<i>Centropyxis aerophila</i>		Cyrtophoryda sp.		
<i>Centropyxis</i> sp.		Ciliata sp. 1		
<i>Cyclopyxis</i> sp. 1		Ciliata sp. 2		
<i>Cyclopyxis</i> sp. 2		Ciliata sp. 3		
<i>Trinema lineare</i>				
<i>Arcella artocrea</i>				
<i>Cyphoderia</i> sp.				
<i>Cryptodiffflugia oviformis</i>				

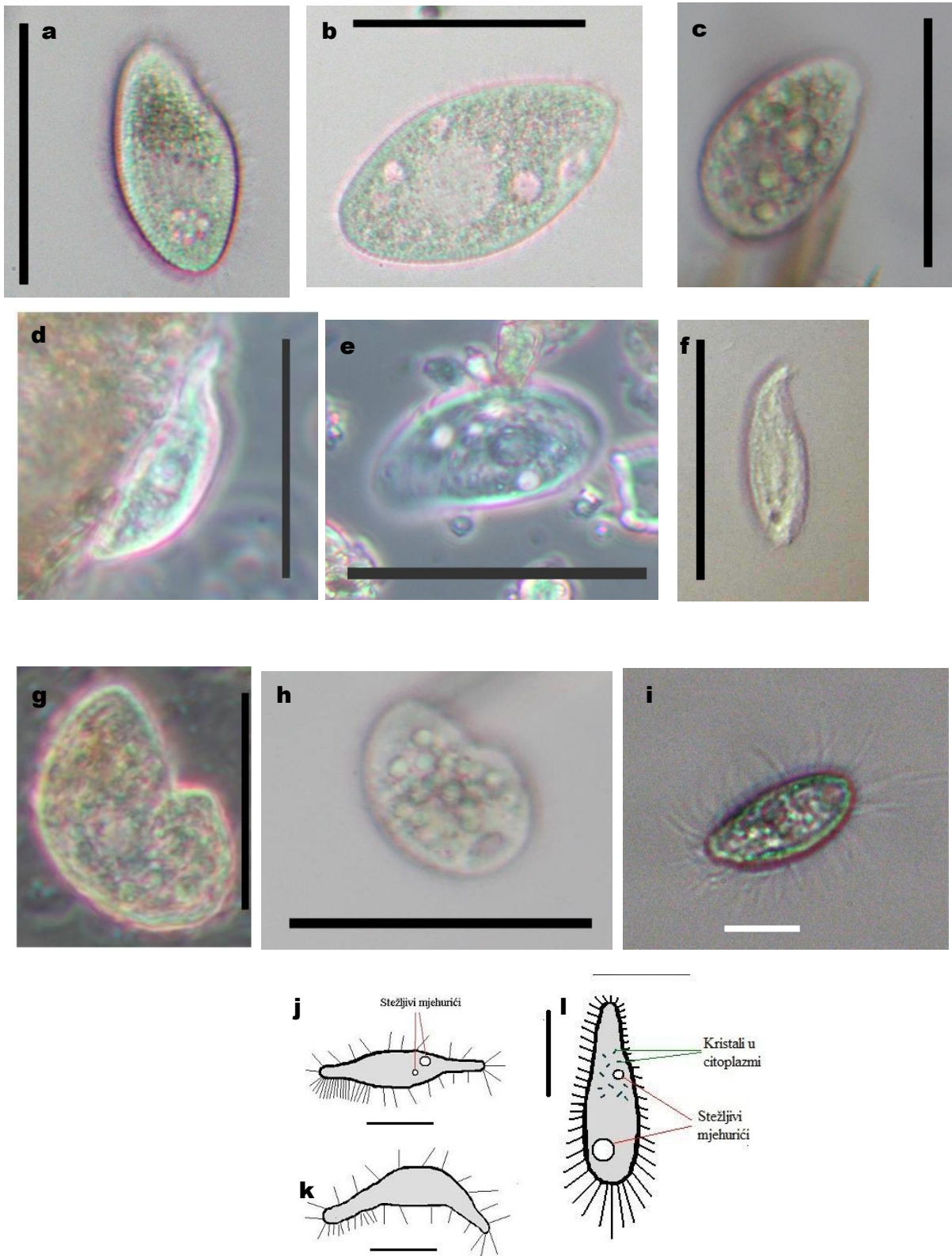
Tablica 3. Zabilježene svojte praživotinja tijekom šestomjesečnog istraživanja na mikrostaništima lokve u glini Kalvarija (LG-K) i lokve u glini Separe (LG-S).

Okučene amebe	Sunašca	Trepetljikaši	Bičaši	Gole amebe
<i>Euglypha tuberculata</i>	<i>Actinophrys sol</i>	<i>Colpoda steinii</i>	Nanoflagellata sp. 1	<i>Vahlkampfia</i> sp. 2.
<i>Euglypha laevis</i>	<i>Oxnerella</i> sp.	<i>Colpoda</i> sp.	Nanoflagellata sp. 2	
<i>Tracheleuglypha dentata</i>		<i>Cyclidium glaucoma</i>	Nanoflagellata sp. 3	
<i>Trinema lineare</i>		<i>Cinetochilum margaritaceum</i>	Nanoflagellata sp. 4	
<i>Cyphoderia</i> sp.		<i>Cohnilembus vexillarius</i>	Nanoflagellata sp. 5	
<i>Cryptodiffugia oviformis</i>		<i>Glaucoma</i> sp.		
		<i>Sphatidium</i> sp.		
		Nassulida sp. 1		
		Hymenostomata sp. 1		
		Ciliata sp. 3 sp.		

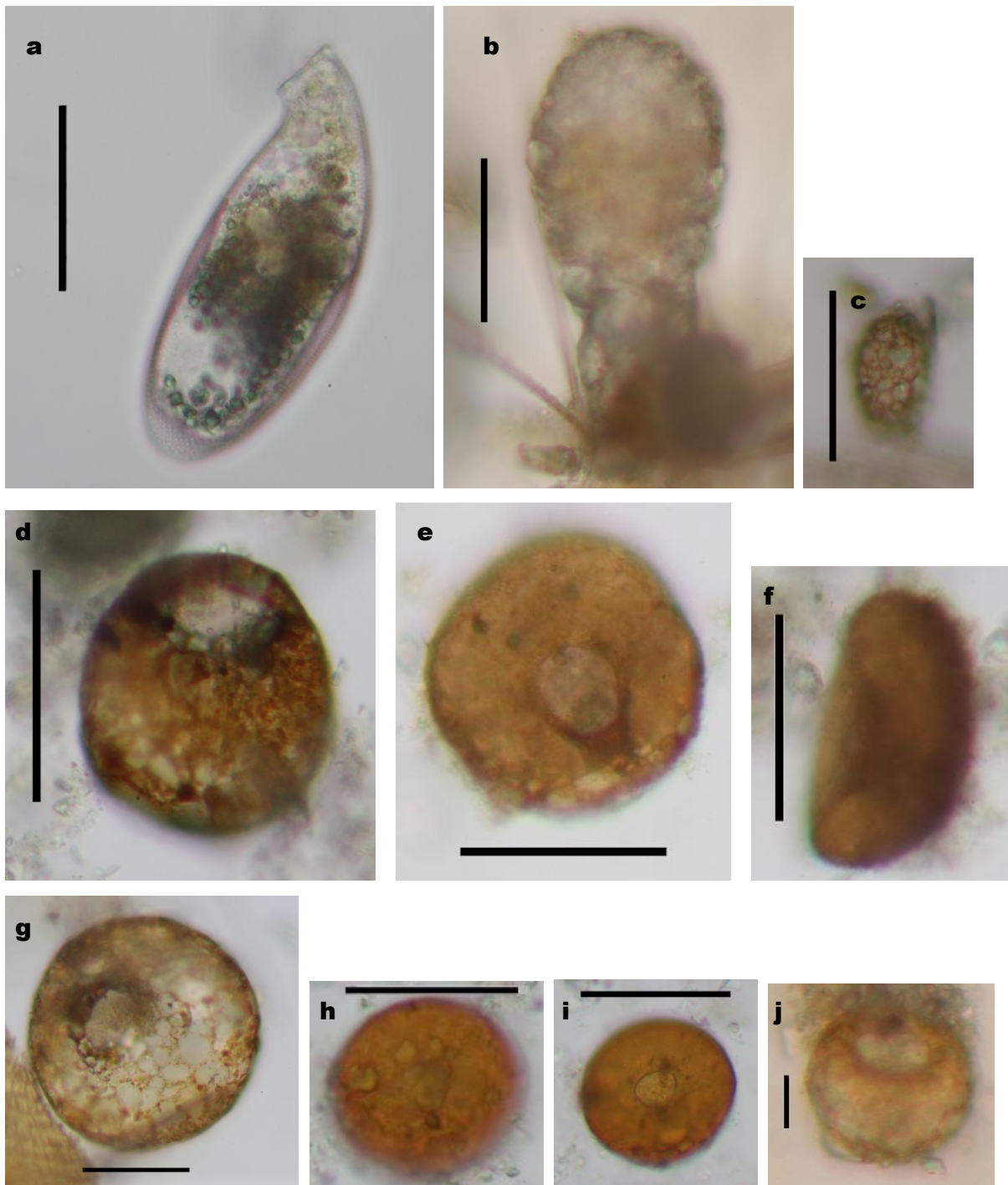
Tablica 4. Zabilježene svojte praživotinja tijekom šestomjesečnog istraživanja na mikrostaništima higropetrik 1 (HP-1) i higropetrik 2 (HP-2).

Okučene amebe	Trepetljikaši	Bičaši
<i>Euglypha laevis</i>	Nassulida sp. 1	Nanoflagellata sp. 1
<i>Euglypha</i> sp.	Nassulida sp. 2	Nanoflagellata sp. 2
<i>Centropyxis aerophila</i>	Hymenostomata sp. 2	Nanoflagellata sp. 3
<i>Centropyxis</i> sp.		
<i>Cyclopyxis</i> sp. 3		
<i>Trinema lineare</i>		
<i>Arcella rotundata</i>		

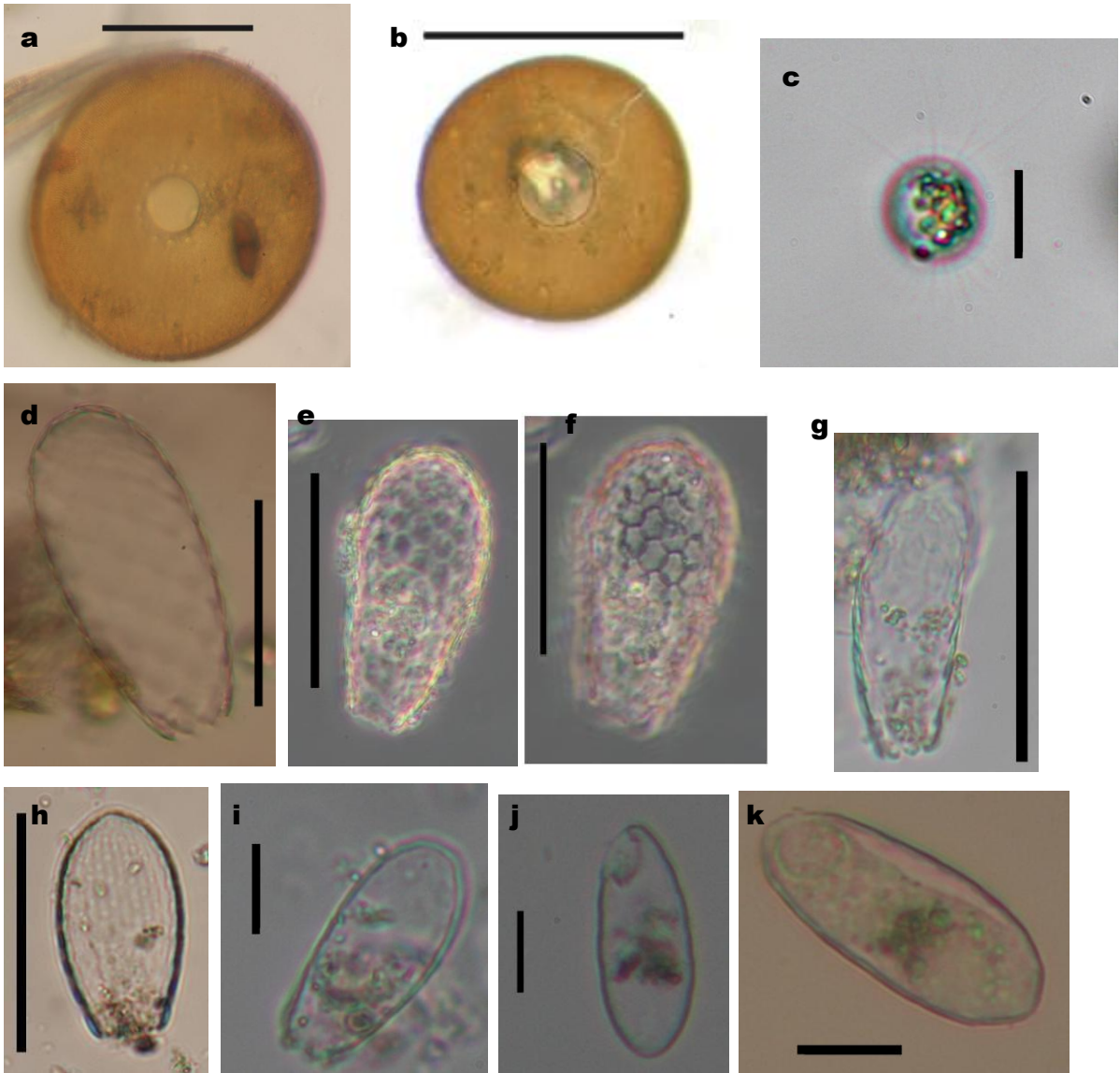
Na slikama 13, 14, 15 i 16 i 17 se nalaze fotografije trideset i šest vrsta praživotinja i dva crteža čestih vrsta trepetljikaša. Ostale vrste nije bilo moguće fotografirati zbog njihovog jako brzog kretanja pa nije bilo moguće napraviti dovoljno kvalitetne slike na kojima bi se mogle uočiti karakteristike pojedinih svojti.



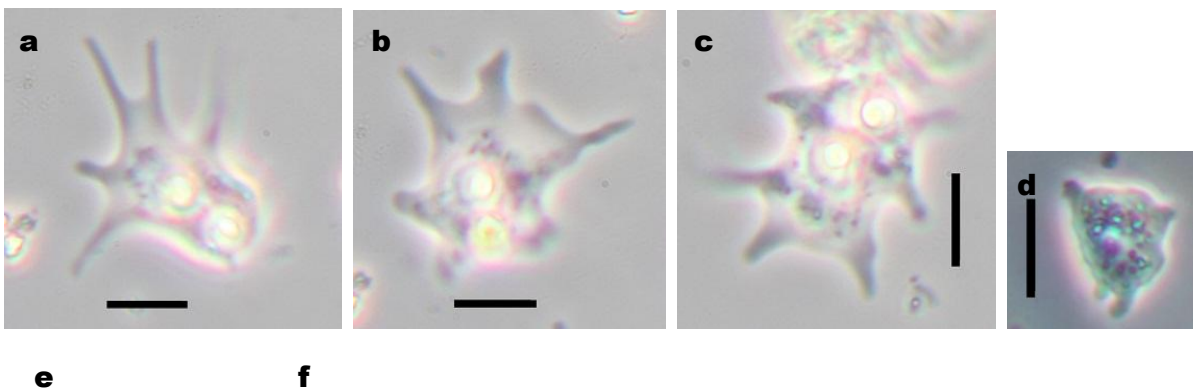
Slika 13. Trepetljikaši: *Glaucoma* sp. (a, b); *Hymenostomata* sp. 1. (c); *Nassulida* sp. 1 (d, e); *Litonotus lamella* (f); *Colpoda* sp. (g); *Colpoda steinii* (h); *Cyclidium glaucoma* (i); *Cohnilembus vexillarius* (j); bočni izgled vrste *Cohnilembus vexillarius* (k); Ciliata sp. 3sp. (l) (Skala a-h = 50 μ m; skala i-l = 10 μ m) (Fotografije i crteži: Najla Kajtezović).

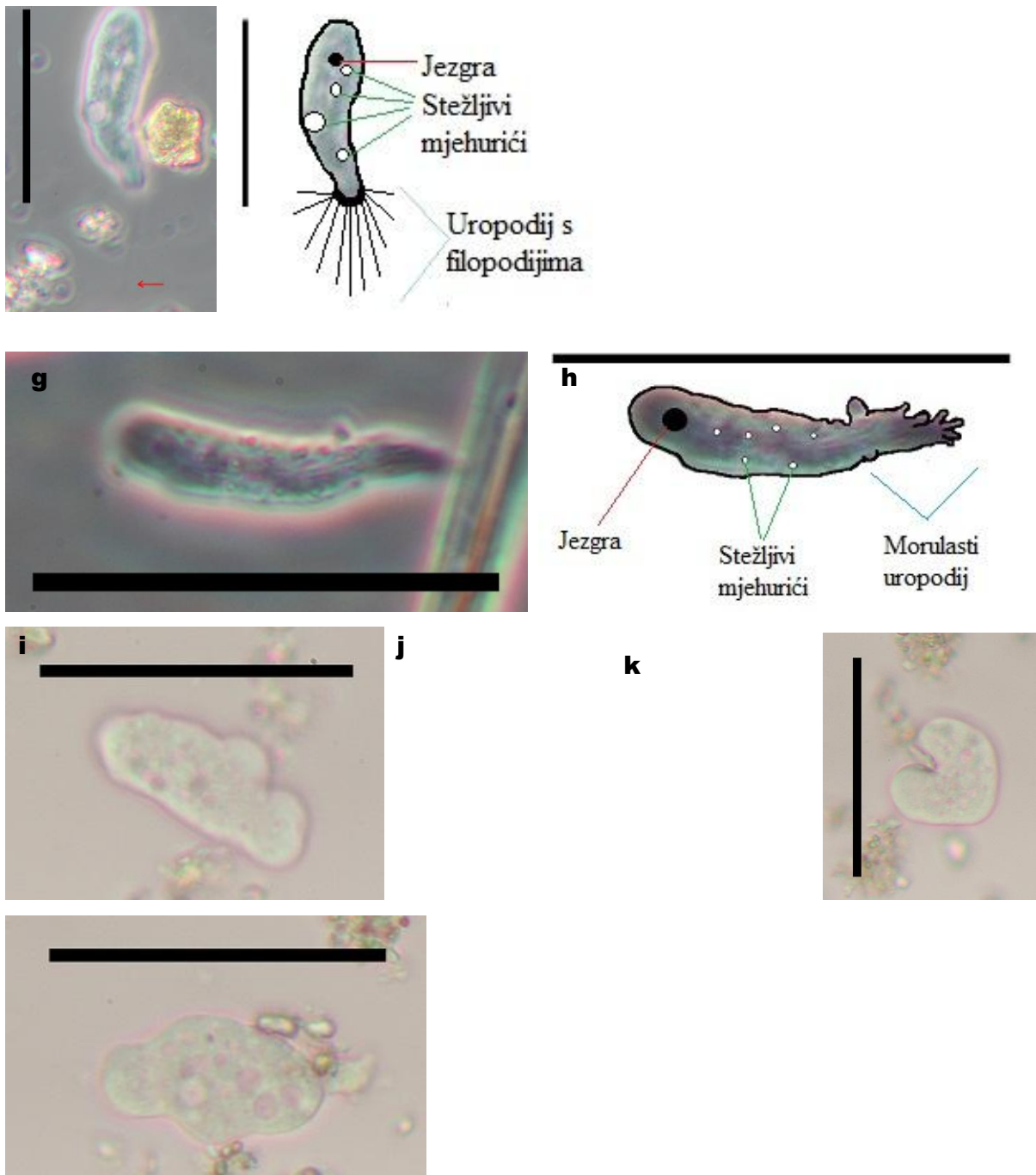


Slika 14. Okučene amebe: *Cyphoderia* sp. (a); *Diffflugia oblonga* (b); *Diffflugia* sp. (c); *Centropyxis aerophila* (d); *Centropyxis* sp. 1 (e); *Centropyxis* sp. 1 bočni izgled (f); *Cyclopyxis* sp. 1 (g); dorzalni izgled ljušturice *Cyclopyxis* sp. 2 (h); ventralni izgled ljušturice *Cyclopyxis* sp. 2 (i); *Centropyxis* sp. 2 (j)(Skala a-i = 50 μ m; skala j = 10 μ m)(Fotografije: Najla Kajtezović).

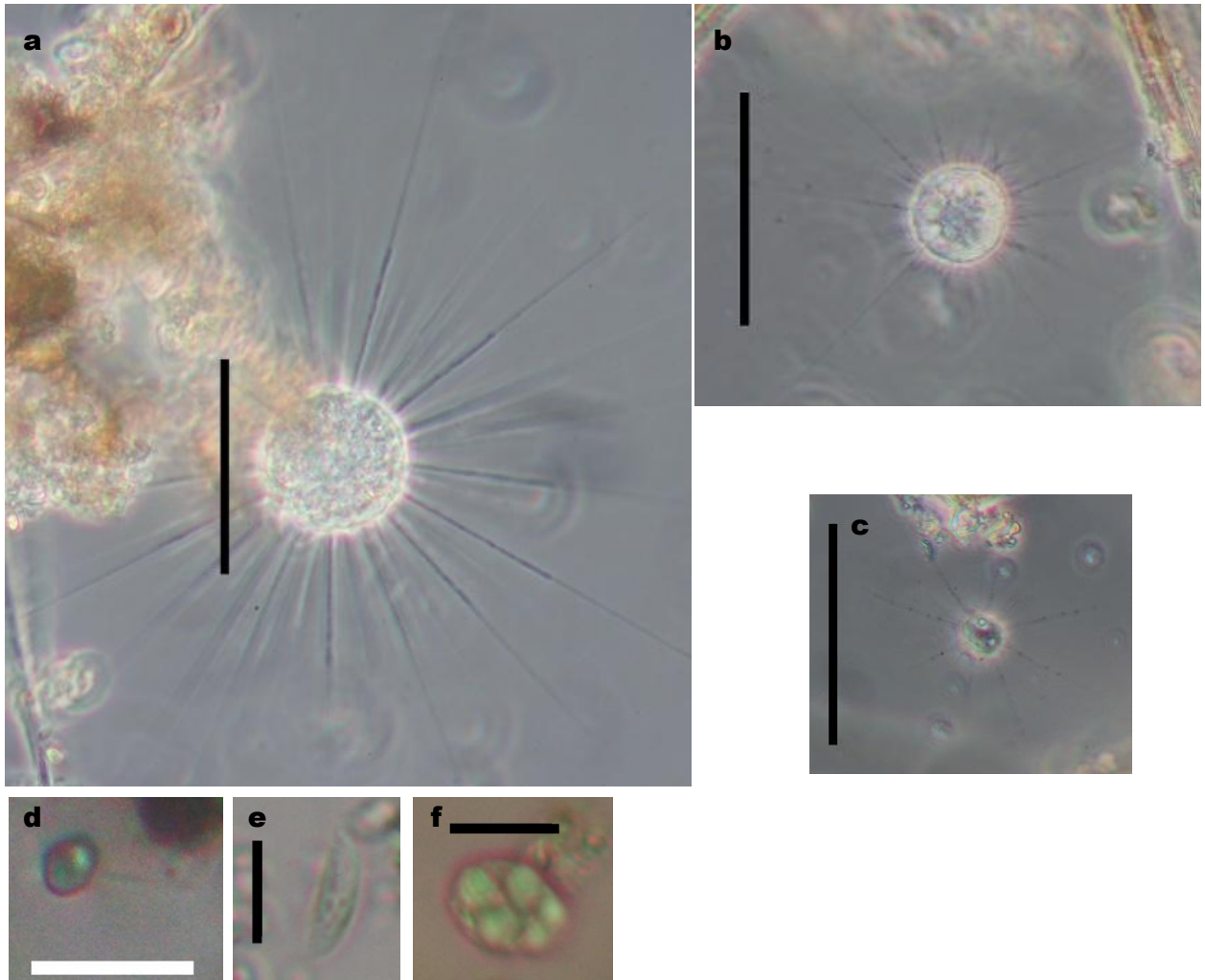


Slika 15. Okučene amebe: *Arcella artocrea* (a); *A. rotundata* (b); *Cryptodiffugia oviformis* (c); *Euglypha tuberculata* (d); *Tracheleuglypha dentata* (e, f); *Euglypha* sp. (g); *Euglypha rotunda* (h); *Euglypha laevis* (i); *Trinema lineare* (j, k)(Skala a-b, d-h = 50 µm; skala c, i-k = 10 µm)(Fotografije: Najla Kajtezović).



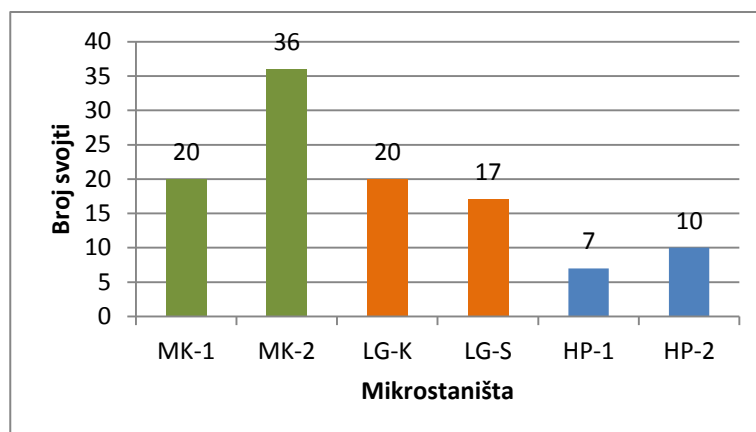


Slika 16. Gole amebe: *Mayorella* sp. 1 (a-c); *Mayorella* sp. 2 (d); *Vahlkampfia* sp. 1 s filopodijima na uropodiju (e, f); *Vahlkampfia* sp. 2 s morulastim uropodijem (g, h); Amoebida sp. 1 (i-k)(Skala a-d = 10 μ m; skala e-k = 50 μ m)(Fotografije i crteži: Najla Kajtezović).



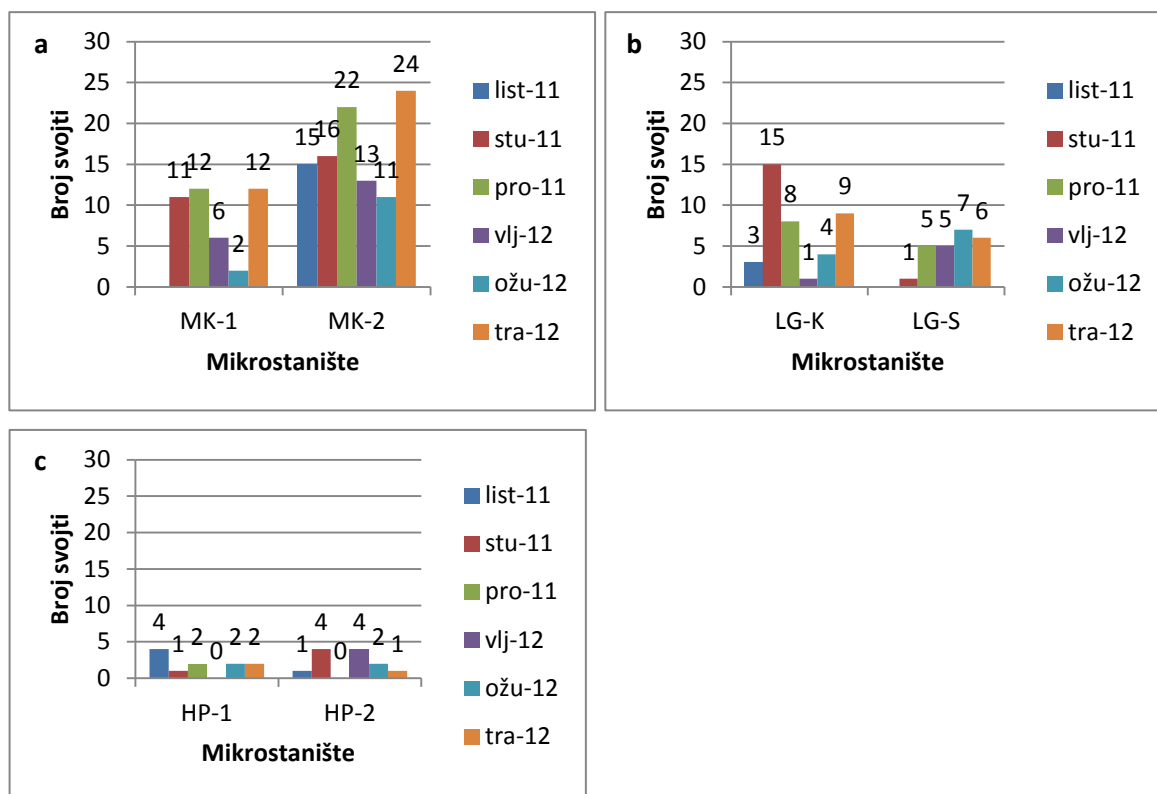
Slika 17. Sunašca: *Actinophrys sol* (a); *Heterophrys* sp. (b); *Oxnerella* sp. (c) i bičaši: Nanoflagellata sp. 1 (d); Nanoflagellata sp. 2 (e); Nanoflagellata sp. 3 (f)(Skala a, b = 50 μ m; skala c-f = 10 μ m)(Fotografije: Najla Kajtezović).

Tijekom šestomjesečnog istraživanja (Slika 18) na mikrostaništu mikrokamenice 2 (MK-2) zabilježen je najveći broj vrsta – trideset i šest, dok je na higropetiku 1 (HP-1) zabilježeno najmanje vrsta – njih sedam. Ako pogledamo sve postaje, najveća biorazolikost je zabilježena u mikrokamenicama, potom slijede lokve u glini, a najmanja biorazolikost zabilježena je na higropetriku.



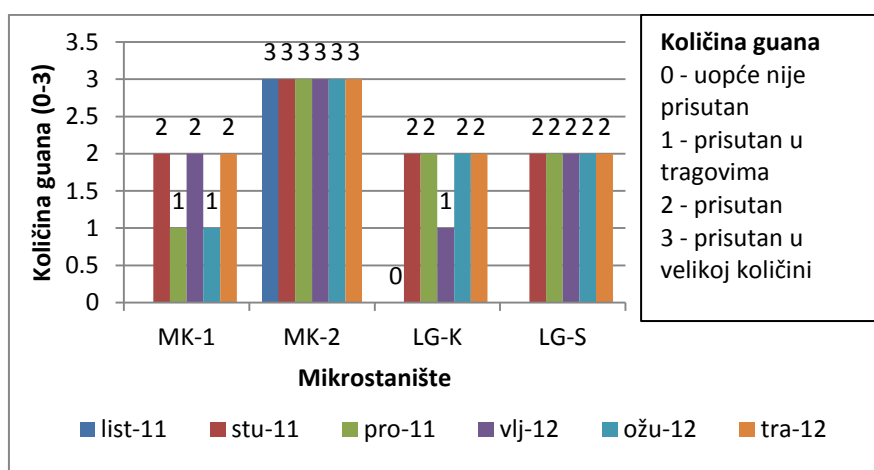
Slika 18. Ukupan broj zabilježenih vrsta na mikrostaništima nakon šestomjesečnog razdoblja istraživanja.

Mjesečna raspodjela broja vrsta na mikrostaništima (Slika 19) pokazuje velike varijacije brojnosti vrsta na mikrostaništima u različitim mjesecima. Jedino se na postaji s mikrokaenicama može vidjeti slična raspodjela brojnosti s maksimumom u travnju 2012. i minimumom u ožujku 2012. godine.



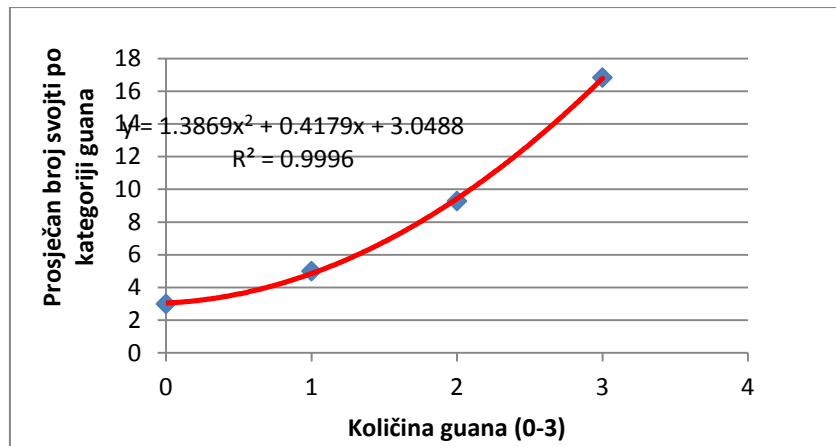
Slika 19. Brojnost svojiti praživotinja u mikrokaenicama (MK-1, MK-2)(a), lokvama s glinom (LG-K, LG-S)(b) i higroperiku (HP1, HP2)(c) tijekom šestomjesečnog razdoblja istraživanja.

U špilji Veternica su tijekom cijelog razdoblja istraživanja boravile kolonije šišmiša koje su se sastojale pretežito od rodova *Rhinolophus* i *Myotis*. Padom vanjske temperature šišmiši su migrirali i u dublje dijelove špilje. U listopadu 2011. godine šišmiši su se nalazili samo u Koncertnoj dvorani, dok su u svim ostalim mjesecima kolonije bile raspoređene po cijelom turističkom dijelu špilje. Kolonije šišmiša nisu zabilježene jedino u Separeu, ali se njihova povremena prisutnost očitovala preko ostatka guana u lokvama s glinom. U travnju je primijećeno buđenje većeg broja jedinki iz hibernacije koje su se puno aktivnije kretale po špilji te odlazile na hranjenje izvan špilje producirajući prilikom povratka svježi guano u špilji. Guano nije zabilježen (makroskopski ni mikroskopski) jedino na dva higropetrika u Separeu. Količina guana na mikrostaništima prikazana je na slici 20. Unatoč stalnoj prisutnosti guana, broj praživotinja u različitim mjesecima pokazivao je znatne razlike (Slika 19), što eventualno upućuje na različitu hranjivu vrijednost guana.



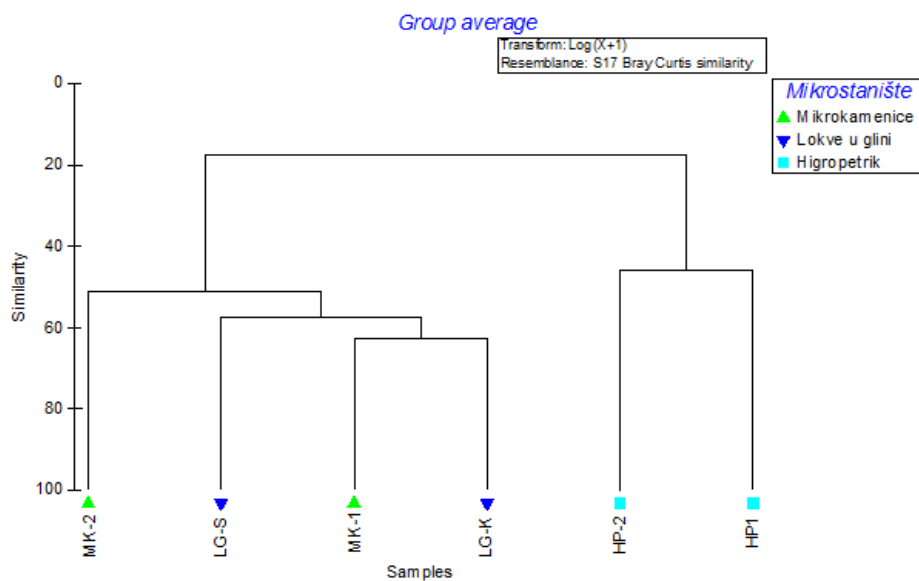
Slika 20. Količina guana na mikrostaništima tijekom šestomjesečnog razdoblja istraživanja.

Kada se usporedi prosječan broj svojti s određenom kategorijom guana sa svih postaja u svim mjesecima dobije se graf (Slika 21) na kojem se nakon polinomske regresijske analize ($R^2=0,9996$) vidi da postoji značajna korelacija između količine guana i bioraznolikosti, tj. da broj svojti praživotinja gotovo eksponencijalno raste s porastom količine guana.



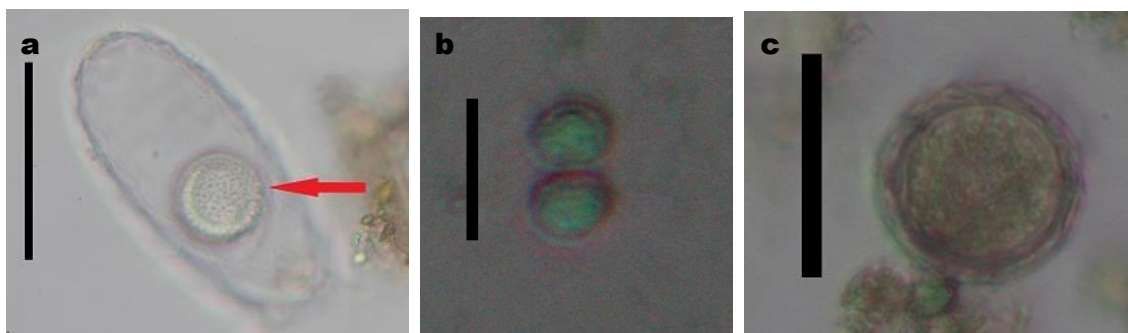
Slika 21. Korelacija između prosječnog broja zabilježenih svojti u mikrokamenicama i lokvama u glini po pojedinoj kategoriji količine guana (0-3).

Analiza sličnosti među mikrostaništima na osnovu prosjeka za šest mjeseci pomoću Bray-Curtisovog indeksa sličnosti (Slika 22) pokazala je da mikrostaništa možemo svrstati u dva velika klastera. Prvi klaster uključuje samo dva higropetika (HP) sa sličnošću od 48%, a drugi uključuje lokve u glini (LG) i mikrokamenice (MK) sa indeksom sličnosti 51%. Međutim, mikrokamenice (MK) se ne grupiraju zajedno već su odvojena. Lokve u glini u Kalvariji (LG-K) su grupirana prema sličnosti od 63% s mikrokamenicama 1 (MK-1) u jedan klaster, dok su mikrokamenice 2 (MK-2) svrstane u poseban klaster.



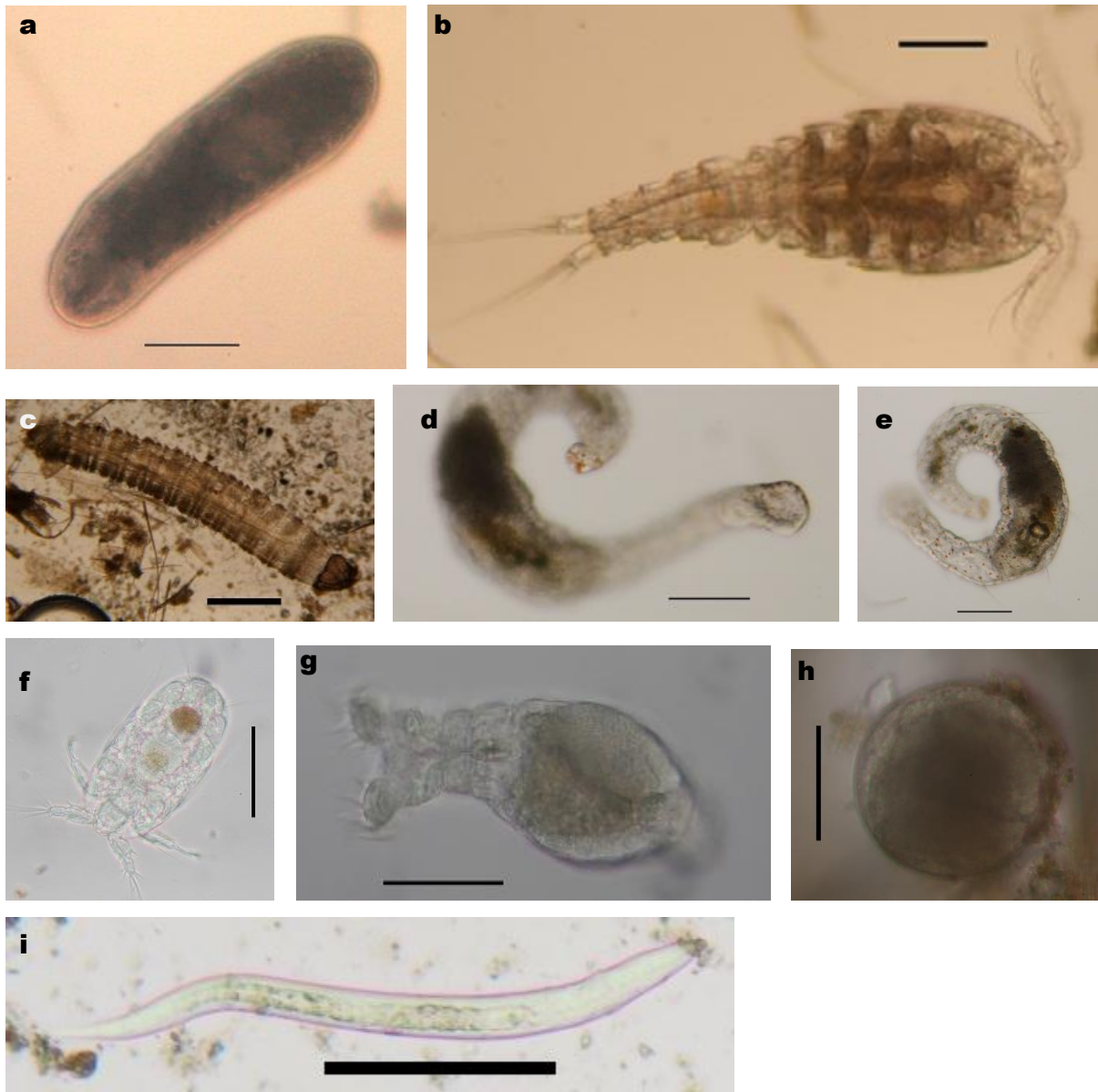
Slika 22. Prikaz Bray-Curtisovog indeksa sličnosti među mikrostaništima na osnovu prosječnih mjesečnih vrijednosti brojnosti vrsta.

Na postajama s mikrokamenicama u svim mjesecima su pronađene ciste praživotinja. Ciste su zabilježene i u uzorku iz lokvi u glini u Kalvariji u studenom 2011. godine. Sudeći prema morfologiji cisti, radi se o cistama golih i okućenih ameba, dok su neke ciste ostale neidentificirane (Slika 23).



Slika 23. Cista (strelica) unutar ljušturice okućene amebe *Euglypha tuberculata* (Skala = 50 μm)(a); neidentificirane ciste praživotinja (b); cista gole amebe (c)(Skala b,c = 10 μm)(Fotografije: Najla Kajtezović).

Osim praživotinja, na promatranim mikrostaništima zabilježeno je prisustvo mikrometazoa (Slika 24). U mikrokamenicama su zabilježeni: oblići, kolnjaci, vodene grinje, maločetinaši, veslonošci i virnjak, dok su u lokvama u glini zabilježeni: oblići, kolnjaci, maločetinaši, vodene grinje i ličinka kukca. Na higropetriku su zabilježeni: kolnjaci, oblići i vodene grinje. Sporadično su pronađena i jaja mikrometazoa.



Slika 24. Zabilježene životinje u istraživanim mikrostaništima: virnjak (a); veslonožac (b); ličinka kukca (c); maločetinaš (d, e); vodena grinja (f); kolnjak (g); jaje mikrometazoa (h); oblič (h)(Skala a-e, i = 100 μ m; skala f-g = 50 μ m)(Fotografije: Najla Kajtezović).

6. Rasprava

Mikroklimatske karakteristike na tri postaje u špilji Veternica koje su praćene tijekom sedam mjeseci pokazuju da su temperatura i relativna vlažnost zraka podložne puno manjim varijacijama u odnosu na vrijednosti izvan špilje. Modifikatorski utjecaj špilje na njenu mikroklimu očituje se osobito zbog manjih varijacija praćenih parametara na postajama Separe i Kalvarija koje su puno udaljenije od ulaza od postaje Koncertna dvorana na kojoj su zabilježene najveće amplitude mjerenih parametara što se poklapa s istraživanjima mikroklime u drugim špiljama (Gottstein Matočec i sur. 2002). Relativna vlažnost zraka nije pokazivala vezu s vanjskom vlažnošću zraka što znači da ona direktno ovisi o promjenama vlažnosti u samoj špilji, tj. u hidrološki aktivnim dijelovima špilje. Vlažnost mikrostaništa pokazuje pravilne fluktuacije s obzirom na količinu padalina zabilježenih u području iznad špilje. Povećanje kategorije vlažnosti mikrostaništa događalo se s malim vremenskim odmakom u odnosu na oborine na površini iznad Veternice što upućuje na složenu epikršku cirkulaciju vode koja uključuje brze tokove koji naglo povećavaju vlažnost mikrostaništa i spore tokove koji konstantno opskrbljuju vodom proučavana mikrostaništa koja nisu niti jednom presušila tijekom sedmomjesečnog praćenja. Ovakav rezultat upućuje na složenu epikršku cirkulaciju i potencijal epikrša iznad Veternice da akumulira veliku količinu vode što se poklapa s hidrološkim istraživanjima na drugim krškim područjima (Trček 2003). Metoda korištena za određivanje vlažnosti mikrostaništa koja je prvi put primijenjena u ovom istraživanju ima veliki potencijal za primjenu u proučavanju špiljskih mikrostaništa i hidrologije krša pošto prati vrlo male fluktuacije procjedne vode. Nije uočena povezanost između bioraznolikosti praživotinja, mikroklimatskih karakteristika i vlažnosti staništa, no to ne mora nužno značiti da takva povezanost ne postoji već ju nije bilo moguće registrirati metodama korištenima u ovom istraživanju. Strujanje zraka nije zabilježeno ni na jednoj postaji u špilji iako je dokazano da ono postoji u Veternici (Ozimec i sur. 2003), jer termohigroanemometar korišten u ovom istraživanju ima krilnu izvedbu anemometra koja ne može mjeriti male brzine strujanja zraka. Razlog zbog kojeg je to strujanje osobito malo je i činjenica da se ispitivana staništa nalaze u relativno velikim dvoranama u kojima je tok zraka laminaran za razliku od uskih kanala kroz koje se zrak brže i turbulentnije giba.

Tijekom šestomjesečnog istraživanja u špilji Veternica pronađeno je četrdeset i sedam vrsta praživotinja na šest mikrostaništa. Najveća bioraznolikost zabilježena je u mikrokamenicama na postaji Koncertna dvorana gdje je zabilježeno ukupno trideset i šest

(mikrokamenice 2), odnosno dvadeset vrsta (mikrokamenice 1). Velika bioraznolikost praživotinja u mikrokamenicama u Koncertnoj dvorani može se objasniti prije svega s velikom količinom guana koji je zabilježen tijekom cijelog istraživanja. Nadalje, debljina epikršskog sloja koji dijeli nadzemlje od špilje je puno manja od one za druge lokacije (Lacković i sur. 2011) pa to povećava vjerojatnost prijenosa cisti s površine u špilju što su dokazali Harvey i suradnici (2008) na primjeru cisti vrste *Cryptosporidium parvum*. Koncertna dvorana je najbliža ulazu u špilju što znači da je najizloženija cistama koje mogu ući u špilju posredstvom zračnih strujanja (Gottstein Matočec i sur. 2002), a ne treba zanemariti ni utjecaj velikog broja posjetioca u špilji. Zanimljiva razlika javila se između postaje mikrokamenice 1 (MK-1) i mikrokamenice 2 (MK-2) koje su udaljene samo 1 m, ali imaju različite izvore vode i kao posljedica te razlike u mikrokamenicama 1 (MK-1) postoje naslage gline. Analizom bioraznolikosti i brojnosti pomoću Bray-Curtisovog indeksa sličnosti ova dva mikrostaništa nisu svrstana skupa već je sličnost između lokvi u glini i mikrokamenica 1 (MK-1) puno veća te su svrstane u poseban klaster. Najveća sličnost zabilježena je između mikrokamenica 1 (MK-1) i lokvi u glini u Kalvariji (LG-K). Nije moguće zaključiti na koji način glina utječe na bioraznolikost. Jedan od mogućih čimbenika je potencijalno mehaničko uništavanje praživotinja prilikom manipulacije sadržajem uzorka, a ne treba zanemariti ni utjecaju manje količine guana u mikrokamenicama 1 (MK-1). Ovakvi rezultati upućuju na vrlo složene čimbenike koji utječu na bioraznolikost.

Važna paralela između zajednica mikrokamenica 1 (MK-1) i mikrokamenica 2 (MK-2) je u tome da se točno po mjesecima može pratiti porast, odnosno pad bioraznolikosti na oba mikrostaništa. To upućuje da ova dva mikrostaništa imaju zajednički izvor hranjivih tvari (neovisan o guanu) i cisti, odnosno aktivnih praživotinja, koji je neovisan o guanu. Jedini takav mogući izvor je procjedna voda za koju se zna da donosi hranjive tvari u špilju i ujedno donosi nove ciste i aktivne praživotinje s površine. Donos novih cisti i aktivnih praživotinja ovdje nije nužan kako bi došlo do promjene broja i sastava vrsta budući da svako mikrostanište sadrži veći broj vrsta u obliku kriptične bioraznolikosti. Kakav će biti sastav zajednica praživotinja ovisi o uvjetima koji će na takvim staništima vladati (Hausmann i sur. 2003). Drugi faktor koji može biti razlog manjem broju zabilježenih vrsta u mikrokamenicama 1 (MK-1) je gustoća populacija. Što je gustoća populacije neke praživotinje manja (u ovom slučaju zbog manje količine hranjivih tvari – guana), veća je vjerojatnost da neće biti zabilježena i na taj način se pogrešno dobiva rezultat da je

bioraznolikost na nekom staništu manja. Ova paralela se može primijeniti i na bioraznolikost na ostalim mikrostaništima.

Nakon šestomjesečnog praćenja lokvi u glini zabilježeno je ukupno dvadeset svojti praživotinja (lokve u glini u Kalvariji), donosno sedamnaest svojti (lokve u glini u Separeu). Visoka bioraznolikost u ovim mikrostaništima može se pripisati konstantno prisutnom guanu koji je povećavao energetske potencijal ovih mikrostaništa. Mogući razlozi zbog kojih ova dva mikrostaništa pokazuju samo pedeset postotnu sličnost prema Bray-Curtisovom indeksu sličnosti je činjenica da se nalaze na velikoj udaljenosti jedno od drugog (Separe i Kalvarija), te da su puno više podložna utjecaju posjetitelja u špilji budući da su na njima pronađeni tragovi gaženja. Jedan od razloga manje bioraznolikosti može biti i sama glina koja otežava reprezentativno uzorkovanje i na taj način se može doći do krivih rezultata. Vandel (1965) navodi da su u lokvama u glini u drugim špiljama pronađeni trepetljikaši, bičaši, gole i okučene amebe što se poklapa sa vrstama koje su zabilježene u Veternici. Međutim, Vandel (1965) naglašava da su gole amebe često bile dominantna skupina praživotinja, dok je u ovom istraživanju zabilježena samo jedna gola ameba (*Vahlkampfia* sp.) u lokvama u glini u Kalvariji. U lokvama u glini u špilji Veternica prvi put je zabilježen i jedan predstavnik sunašaca (*Oxnerella* sp.) koji do sada nije zabilježen na ovakvom tipu mikrostaništa.

Na mikrostaništu higropetrik u šestomjesečnom razdoblju istraživanja zabilježeno je sedam (higropetrik 1), odnosno deset svojti praživotinja (higropetrik 2). Na dva istraživana higropetrika zabilježene su: tri vrste bičaša (Nanoflagellata), sedam vrsta okučenih ameba (*Euglypha laevis*, *Euglypha* sp., *Centropyxis aerophila*, *Centropyxis* sp., *Trinema lineare*, *Arcella rotundata*, *Cyclopyxis* sp.) i tri vrste trepetljikaša (dvije vrste iz skupine Nassulida, i jedna vrsta iz skupine Hymenostomata). Praživotinje s higropetrika do sada nisu zabilježene niti istraživane niti u jednom podzemnom staništu prema nama dostupnoj literaturi te je stoga ovaj rezultat osobito važan. Međutim, špiljski higropetrik je prepoznat kao važno stanište za životinje kao što su kornjaši rodova *Tartariella*, *Hadesia*, *Nauticiella*, *Radziella*, *Cansiella*, rakušca *Typhlogammarus mrazek* i pijavice *Croatobranchnus mestrovi* iako se o njihovoj ekologiji zna jako malo (Sket 2004). Kao izvori hrane ovih životinja navode se organske čestice s površine i bakterije, dok se prisutnost praživotinja uopće ne spominje ni kao potencijalno moguća. Čak ni nakon detaljnijih istraživanja usnog aparata i mehanizma hranjenja kornjaša roda *Cansiella* i analiza veličine čestica koje ovi kornjaši mogu filtrirati nije niti jednom spomenuta mogućnost da jedan dio frakcije hrane ovih organizama potencijalno čine praživotinje (Paoletti i sur. 2011). Veliki metodološki problem zabilježen

tijekom istraživanja higropetrika je velika količina kristala kalcita i gline u uzorcima. Osim što otežavaju mikroskopsko pregledavanje, kristali kalcita mogu fizički zgnječiti jedan dio populacije praživotinja i na taj način utjecati na stvarni sastav zajednica. Ljušturice okućenih ameba su puno otpornije na mehanička oštećenja (iako su bili jako česti nalazi napuklih ljušturica) pa je i broj njihovih svojti veći u odnosu na druge skupine, no treba uzeti u obzir mogućnost da je bioraznolikost higropetrika puno veća na osnovu sporadične pojave trepetljikaša i bičaša. Takav problem bi se u budućnosti mogao zaobići usavršavanjem metoda uzorkovanja. Korištenje dodatne sterilne vode prilikom uzorkovanja sa ovog staništa koje ima manjak vode također može negativno utjecati na praživotinje osjetljive na manje promjene osmotskog tlaka.

Nakon šestomjesečnog razdoblja istraživanja precizno do vrste je determinirano samo 17 svojti, a 15 svojti je determinirano do kategorije roda. Veliki problem prilikom determinacije praživotinja predstavljala je njihova mala brojnost (često samo jedna zabilježena jedinka) i mala veličina (većina jedinki je manja od 50 μm), ali i činjenica da većina zabilježenih svojti praživotinja spada u rijetke vrste i nije navedena u većini ključeva za determinaciju. Poteškoće pri determinaciji vrsta u špiljama zabilježili su i drugi istraživači, tako Coppellotti i Guidolin (1999) napominju da je 1/3 pronađenih svojti u špilji Covolo della Guerra prvi put zabilježena na bilo kojem staništu u Italiji. Tomu ne ide u prilog ni činjenica da se pretpostavlja da 70% vrsta praživotinja u terestričkim okolišima, pod čijim jakim utjecajem su špilje, još uvijek nije opisana. Problem determinacije vrsta prisutan je i na drugim, često puno bolje istraženim, nadzemnim staništima (Corliss 2002).

Vidljiva je jasna korelacija između prisutnosti šišmišjeg guana, visoke bioraznolikosti praživotinja, ali i pojavljivanja mikrometazoa i cisti praživotinja. Takvi rezultati se poklapaju s drugim istraživanjima o populacijama praživotinja u špiljama (Coppellotti i Guidolin 1999; Golemansky i Bonett 1994; Vandel 1965). Kvantifikacija količine guana (kategorije od 0 do 3) koja je prvi put primijenjena u ovom radu pokazala se dobrim parametrom za opisivanje ovisnosti bioraznolikosti praživotinja o količini guana.

Kada se uspoređi bioraznolikost svojti na različitim mikrostanjima pojedinačno po mjesecima vidljive su velike fluktuacije. Takav rezultat je iznenađujući budući da mikroklimatski uvjeti pokazuju da su podzemna staništa okoliši u kojima su amplitude promjena temperature, relativne vlažnosti zraka i količine guana tijekom trajanja ovog istraživanja relativno male. To upućuje na postojanje mnogih kompleksnih čimbenika koji

utječu na bioraznolikost praživotinja u špilji Veternica te su potrebna daljnja dugotrajna istraživanja kako bi se razumjeli utjecaji pojedinih čimbenika.

Na osnovu provedenog istraživanja mogu se izdvojiti četiri bitna faktora koji utječu na bioraznolikost praživotinja u Veternici: prisutnost guana, donos hranjivih tvari procjednom vodom, unos aktivnih stadija praživotinja u špilju i unos praživotinjskih cisti. Guano, konstantno u većoj ili manjoj mjeri produciraju kolonije šišmiša, koje borave u špilji, a on se nakon toga ugrađuje u biomasu bakterija koje su glavna hrana većine praživotinja, a potencijalno može služiti kao direktna hrana za detritivne praživotinje. Zbog velike energetske vrijednosti guana gustoća populacija bakterija može potaknuti nagli rast brojnosti i bioraznolikosti praživotinja u podzemnim staništima (Gottstein Matočec i sur. 2002; Hausmann i sur. 2003) te se iz ovog istraživanja može izvesti zaključak da je dostupnost hrane glavni limitirajući faktor za bioraznolikost praživotinja u špilji Veternica. Najoligotrofnijim staništem se može smatrati špiljski higropetrik, a staništem s najvećim trofičkim stupnjem se može smatrati mikrokamenice, dok su lokve u glini između ta dva stupnja s obzirom na količinu dostupnih hranjivih tvari. Porast broja zabilježenih svojiti na mikrostaništima slijedi obrazac porasta dostupne hrane na staništu. Mnogi autori spominju uzorkovanje guana zanemarujući okoliš oko same naslage (Golemansky i Bonett 1994; Vandel 1965). Na taj način nije dovoljno definirano mikrostanište – radi li se o naslagama guana u slobodnoj vodi na stijenskom supstratu, lokvama u glini ili vlažnim naslagama. Različita bioraznolikost na četiri mikrostaništa s guanom tijekom istraživanja u Veternici govori da je potrebno puno detaljnije opisati mikrostanište kako bi se dobila preciznija slika i lakše pratili čimbenici koji utječu na bioraznolikost jer je mikrookoliš u špiljama puno kompleksniji nego što se to uzima u obzir u nekim istraživanjima (primjer novija istraživanja mikrobne zajednice špiljskog mlijeka)(Paoletti i sur. 2011).

Uvriježen je stav da su praživotinje u špiljama po sastavu najbližnje fauni tla (Golemansky i Bonett 1994; Vandel 1965), međutim pojava sunašaca (*Actinophrys sol*, *Oxnerella* sp. i *Heterophrys* sp.) u mikrokamenicama i lokvi u glini, koja su isključivo slatkovodni planktonski organizmi (Finlay i Esteban 1998), daje proučavanim staništima obilježja vodenih staništa iako se radi o jako malim volumenima vode u tim mikrostaništima. Prisutnost trepetljikaša, bičaša i sunašaca upućuje na činjenicu da se u stupcu vode nalazi dispergirani veliki broj bakterija što je netipično za podzemna staništa koja su uglavnom jako oligotrofna i u stupcu vode kod dubljih vodenih staništa gotovo da nema nikakvih organizama (Gottstein Matočec i sur. 2002; Hausmann i sur. 2003) što upućuje na veliku

razliku između većih i manjih vodenih prostora u špiljama. Snažan utjecaj tla očituje se preko velikog broja okućenih i golih ameba na istraživanim mikrostaništima (ukupno dvadeset zabilježenih vrsta). One su dominantne skupine u praživotinjskoj mikrofauni tla, iako se pojavljuju i u akvatičkim sustavima (Foissner 1999; Hausmann i sur 2003.). Međutim, treba uzeti u obzir i činjenicu da okućene i gole amebe, kao i drugi predstavnici iz tla, imaju jako dobre prilagodbe na česta isušivanja, zbog toga je njihova bolja kompetitivnost bila očekivana na mikrostaništima s ograničenom količinom vode kao što je higropetrik. Iznenaduje jedino što na higropetniku nisu pronađene gole već samo okućene amebe. Ta činjenica govori u prilog hipotezi da je moguće da dio vrsta s higropetrika ugine zbog mehaničkog oštećivanja kristalima kalcita.

Drugi razlog veće kompetitivnosti golih i okućenih ameba, koje su gotovo isključivo bentoski organizmi, leži u činjenici da su sva proučavana mikrostaništa imala veliku specifičnu površinu zbog velike količine ostataka krilnih ljuščica i skeleta kukaca (lokve u glini i mikrokamenice), odnosno malu količinu slobodne vode (higropetrik). Veća površina omogućuje veću količinu bakterijskog biofilma. U uzorcima s guanom opažena je velika koncentracija praživotinja unutar ostataka skeleta kukaca. Od okućenih ameba dominiraju *Trinema lineare* i *Cryptodiffugia oviformis*, dok gole amebe nije bilo moguće uočiti unutar nakupina guana već isključivo ako bi se našle na čistom vidnom polju. Zbog specifične morfologije (nepostojan oblik), amebe su jako teško uočljive osobito ako se radi o manjim vrstama tako da je njihov broj u svim uzorcima gotovo sigurno zbog toga i podcijenjen, no to je problem koji se javlja na svim staništima na kojima se proučavaju amebe (Foissner 1999).

Velika bioraznolikost okućenih ameba može se dijelom pripisati i njihovoj specifičnoj morfologiji koja se sastoji od ljušturica različite građe koje su vrlo postojane i očuvaju se relativno dugo nakon ugibanja jedinke. Nažalost, nije uvijek moguće odrediti radi li se o živoj jedinci ili samo praznoj ljušturici jer je ljušturica nekih zabilježenih okućenih ameba gotovo potpuno neprozirna (npr. *Diffugia oblonga*, *Centopyxis aerophila*). Treba uzeti u obzir i mogućnost da su neke od tih praznih ljušturica donesene s površine.

Osim sitnijih okućenih ameba, među krilnim ljuščicama i skeletima kukaca zabilježen je i veliki broj bičaša i nešto manje sitnijih trepetljikaša (*Cinetochilum margaritaceum*) što upućuje na njihovu potencijalnu funkciju zaklona od predatora. Među zabilježenim vrstama na svim tipovima mikrostaništa zabilježene su, bar u jednom mjesecu uzorkovanja, vrste: Nanoflagellata 1, Nanoflagellata 2, *Euglypha laevis* i *Trinema lineare*, dok su prvi put su u špiljskim staništima, prema dostupnoj literaturi (Bastian i sur. 2009; Coppellotti i Guidolin

1999; Golemansky i Bonett 1994; Sigala-Regalado i sur. 2011; Vandel 1965; Walochnik i Mulec 2009), zabilježene vrste trepetljikaša rodova *Sphatidium* i *Cohnilembus*.

Sastav zajednica praživotinja u špiljama pokazuje velika odstupanja na različitim mikrostaništima. Pojava velike razlike u bioraznolikosti i brojnosti praživotinja na mikrokamenicama s glinom i bez nje upućuje na činjenicu da, bez obzira na jednaku izloženost izvoru praživotinjskih cista (procjedna voda, posjetioci, stujanje zraka), sve praživotinje nisu jednako kompetitivne u svakom okolišu.

Praživotinje se često spominju u kontekstu kruženja hranjivih tvari i mineralizacije kao faktor koji povećava učinkovitost produktivnosti bakterija, ali se nikada ne ulazi dublje u njihovo poznavanje niti je njihova uloga u špiljama proučavana u kontekstu mikrobne petlje (Coppellotti i Guidolin 1999; Golemansky i Bonett 1994; Hausmann i sur. 2003; Vandel 1965). Iako za hranidbene mreže u podzemnim staništima vrijedi pravilo da su jednostavne i kratke kao posljedica oligotrofije (Culver i Pipan 2009), prisutnost guana jako mijenja energetska status špilja. To je dobro vidljivo preko špiljskog sinuzija guana koji se može sastojati od velikog broja vrsta sa složenim međuodnosima (Gottstein Matočec i sur. 2002). Formiranje više trofičkih razina može se pratiti i među populacijama praživotinja, npr. pojava predatorskih praživotinja (npr. *Litonotus* sp., *Actinophrys sol*) u uzorcima iz mikrokamenica 2 (MK-2) u kojima je zabilježena i maksimalna količina guana, dok u većini drugih mikrostaništa prevladavaju filtratori i/ili *grejzeri*. Na formiranje složenijih trofičkih razina ukazuje i česta pojava mikrometazoa na staništima s guanom (mikrokamenice i lokve u glini) iako su se oblici, vodene grinje i kolnjaci pojavljivali i na higropetriku. Kolnjaci, oblici, vodene grinje, veslonošci, maločetinaši do sada nisu bili zabilježeni u popisu vrsta koje nastanjuju Veternicu (Ozimec i sur. 2003), no njihovo prisustvo se moglo pretpostaviti jer čine sastavni dio hranidbenih mreža, ali na osnovu ovih podataka nije moguće procijeniti radi li se o stigobiontima ili stigoksenima.

Česti nalazi cisti praživotinja upućuju na veliku kriптиčnu raznolikost istraživanih mikrostaništa. Iako su zabilježene samo ciste golih i okućenih ameba, te svega par neidentificiranih cisti, to ne isključuje postojanje velikog broja cisti drugih praživotinja. Radi se o tome da su ciste golih i okućenih ameba specifične morfologije i vrlo lako su uočljive. Potencijal za veliku kriптиčnu bioraznolikost praživotinja u špiljama razmatrali su i drugi autori koji su praživotinje proučavali uzgajajući ih u kulturama (Coppellotti i Guidolin 1999; Sigala-Regalado i sur. 2011; Walochnik i Mulec 2009) i došli su do istog zaključka.

7. Zaključak

Mikroklimatski uvjeti u špilji Veternica pokazuju tipične karakteristike špiljske mikroklimе čija glavna obilježja su male amplitude promjena temperature i relativne vlažnosti zraka. Hidrološki status istraživanih mikrostaništa u direktnoj je korelaciji s količinom oborina na površini i moguće ga je procijeniti pomoću okularne metode koja se sastoji od šest kategorija za opis vlažnosti (0-5) čime su dobivene i vrijedne informacije o režimu cirkulacije vode kroz epikršku zonu iznad Veternice.

U istraživanju praživotinja u špilji Veternica zabilježeno je ukupno četrdeset sedam vrsta praživotinja na tri tipa mikrostaništa: mikrokamenice, lokve u glini i higropetrik. Zabilježene su svojite iz više sistematskih kategorija: trepetljikaši, bičaši, okućene amebe, gole amebe i sunašca. Među njima prvi put su u špiljama zabilježena dva roda trepetljikaša: *Sphatidium*, te rod i vrsta *Cohnilembus vexillarius*.

Važan rezultat ovog istraživanja je da je prvi put u špiljama dokazano postojanje zajednice praživotinja na higropetniku. Na dva istraživana higropetrika zabilježene su: tri vrste bičaša (Nanoflagellata), sedam vrsta okućenih ameba (*Euglypha laevis*, *Euglypha* sp., *Centropyxis aerophila*, *Centropyxis* sp., *Trinema lineare*, *Arcella rotundata*, *Cyclopyxis* sp.) i tri vrste trepetljikaša (dviije vrste iz skupine Nassulida, i jedna vrsta iz skupine Hymenostomata).

Specifična bioraznolikost i razlike između sličnih mikrostaništa upućuju na veliki broj čimbenika koji utječu na bioraznolikost i rasprostranjenost praživotinja u špiljama.

Najveća bioraznolikost praživotinja zabilježena je u mikrokamenicama, potom lokvama u glini, a najmanja bioraznolikost zabilježena je na higropetniku. Glavni razlog visoke bioraznolikosti praživotinja u mikrokamenicama i u lokvama u glini su velika količina guana koja je u ovom istraživanju kvantificirana na četiri kategorije (0-3) pomoću kojih se može uočiti gotovo eksponencijalni rast bioraznolikosti porastom količine guana.

Mikrofauna praživotinja u Špilji Veternica treba se promatrati kao dijelom modificirana fauna jer je pod jakim utjecajem čovjeka, tj. brojnih posjetioca, koji mogu pospješiti rasprostriranje praživotinjskih cisti na mikrostaništima.

Zajednice praživotinja na istraženim mikrostaništima u špilji Veternica ne mogu se smatrati ni terestričkim ni vodenim već imaju svoje posebne karakteristike. Iz ovih razloga se zajednice praživotinja u špiljama treba promatrati kao zasebnu kategoriju.

8. Zahvale

Najveća hvala mojoj mentorici doc.dr.sc. Renati Matoničkin Kepčija na ogromnoj moralnoj podršci, kvalitetnim savjetima, ustupljenoj literaturi i pomoći tijekom pisanja ovog rada. Osobito sam zahvalna što mi je dopustila da potpuno samostalno osmislim i provedem cijelo istraživanje.

Hvala Hrvatskom biospeleološkom društvu na ustupljenoj opremi, osobito hvala članovima Jani Bedek, Marku Lukiću i Petri Žvorc!

Hvala mr.sc. Josipu Rubiniću na savjetima vezanim uz meteorološki i hidrološki dio rada i doc.dr.sc. Sanji Gottstein na ustupljenoj literaturi i savjetima vezanim uz speleobiologiju; hvala Robertu Bakoviću na savjetima vezanim uz geomorfologiju!

Hvala Milivoju Uroiću iz Speleološkog odsjeka PD Željezničar na ustupljenom nacrtu Veternice!

Hvala Snježani Malić-Limari, Denisu Kovačiću i Normi Fressel iz Parka prirode Medvednica na ustupljenim podacima o Veternici i ljubaznosti! Osobito hvala Denisu na fotografijama mikrostaništa!

Hvala Petri Škuljević, Ines Šimičić i Mili Karlici što su me pratili prilikom izlazaka na teren u Veternicu!

Hvala cijeloj mojoj obitelji (osobito Rusi) na potpori u zadnjih sedam mjeseci! Hvala Mili, Vedranu, Nesi, Nataši, Ivoni, Vedrani i Dei što su bili tolerantni prijatelji! Hvala Bobi na svemu! I na kraju, ali ne manje važno, hvala mom najboljem matorom prijatelju na hrabalovskoj potpori!

9. Literatura

- Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredeicq S., James T.Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., Mccourt R.M., Mendoza L., Moenstrup Ø., Mozley-Standridge S., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A.V., Spiegel F.W., Taylor M.J.R. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**, 399-451.
- Bastian F., Alabouvette C., Saiz-Jimenez C., 2009. Bacteria and free-living amoeba in the Lascaux Cave. *Research in Microbiology* **160**, 38-40.
- Bastian F., Jurado V., Nováková A., Alabouvette C., Saiz-Jimenez C., 2010. The microbiology of Lascaux Cave: Mini-Review. *Microbiology* **156**, 644-652.
- Coppellotti O., Guidolin L., 2002. Ciliate communities in karst caves from North-East Italy. U: *XVI International Symposium of Biospeleology - Abstracts*, Verona, Italy, 8-15 September 2002., Museo Civico di Storia Naturale di Verona (ur. Latella L., Mezzanotte E., Tarocco M.), Università degli Studi – Verona, 33-34.
- Coppellotti O., Guidolin L., 1999. Neglected microscopic organisms (Protozoa): possible bioindicators for karst groundwaters?. Atti Tavola Rotonda "Un importante sistema carsico dei Monti Lessini (Vr): i Covoli di Velo, Verona-Camposilvano, 16-17 aprile 1999., 73-78.
- Corliss J.O. 2002. Biodiversity and biocomplexity of the protists and an overview of their significant roles in maintenance of our biosphere. *Acta Protozoologica* **41**, 199–220.
- Culver D.C., Sket B., 2000. Hotspots of Subterranean Biodiversity in Caves and Wells. *Journal of Cave and Karst Studies* **62**, 11-17.
- Culver D.C., Pipan T. 2009. The biology of caves and other subterranean habitats, Oxford University Press, Oxford.
- Culver D.C., White W.B. (ur.) 2005. Encyclopedia of caves, Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Čepelak M., 1978-1979. Objašnjenja uz nacrt špilje Veternice. *Speleolog* **26/27**, 33.
- Dovgal I.V., Vargovitsh R.S. 2010. Troglobiontic suctorian and apostome ciliates (Ciliophora): An overview, *Natura Montenegrina* **9**, 265-274.

- Finlay B.J., Esteban G.F. 1998. Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function, *Biodiversity and Conservation* **7**, 1163-1186.
- Foissner W. 2006. Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists, *Acta Protozoologica* **45**, 111–136.
- Foissner W., 1999. Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples, *Agriculture Ecosystems & Environment* **74**, 95-112.
- Foissner W., Berger H., 1996. A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology* **35**, 375-482.
- Foissner W., Berger H., Blatterer H., Kohmann F., 1995. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band IV: Gymnostomatea, Loxodes, Suctorina. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft* **1/95**, 1-540.
- Foissner W., Berger H., Kohmann F., 1992. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft* **5/92**, 1-502.
- Foissner W., Berger H., Kohmann F. 1994. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft* **1/94**, 1-548.
- Foissner W., Blatterer H., Berger H., Kohmann F. 1991. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems - Band I: Cyrtophorida, Oligotrichida, Hypotrichia, Colpodea. *Informationsberichte des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft* **1/91**, 1-478.
- Golemansky V., Bonnet L., 1994. Protozoa. U: *Encyclopaedia Biospeleologica*, Vol. 1, (ur. C. Juberthie, V. Decu), Société de Biospéologie, Moulis, Bucarest, 23–33.
- Gottstein Matočec S., Ozimec R., Jalžić B., Kerovec M., Bakran-Petricioli T., 2002. Raznolikost i ugroženost podzemne faune Hrvatske, Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja RH, Zagreb.
- Gunn J. (ur.) 2004. *Encyclopedia of caves and karst science*, Fitzroy Dearborn, New York.
- Harvey, R. W., Metge D. W., Shapiro A. M., Renken R. A., Osborn C. L., Ryan J. N., Cunningham K. J., Landkamer L., 2008. Pathogen and chemical transport in the karst

- limestone of the Biscayne aquifer: 3. Use of microspheres to estimate the transport potential of *Cryptosporidium parvum* oocysts, *Water Resources Research* **44**, 1-12.
- Hausmann K., Hülsmann N., Radek R., 2003. *Protistology*. 3rd completely revised edition. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Berlin – Stuttgart, 44-179.
- Hill B.F., Small E.B., Iliffe T.M., 1986. *Euplotes iliffei* n. sp.; a new species of Euplotes (Ciliophora, Hypotrichida) from the marine caves of Bermuda, *Journal of the Washington Academy of Sciences* **76**, 244-249.
- Kajtezović N., 2011. Preliminarna istraživanja praživotinja u podzemnim staništima u Republici Hrvatskoj. U: *Zbornik sažetaka Međunarodnog znanstveno-stručnog skupa "Čovjek i krš"*, 13.-16.10.2011, Bijakovići (ur. Lučić I., Mulaomerović J), Centar za krš i speleologiju i FDZ Dr. Milanka Brkića, Sarajevo-Međugorje, 58.
- Kahl A. 1930-35. Urtiere oder Protozoa I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). U: *Die Tierwelt Deutschlands* (ur. Dahl F.), G. Fisher, Jena, 1-886.
- Lacković D., 2003. Sige : što su i kako nastaju, Hrvatski prirodoslovni muzej, Zagreb.
- Lacković D., Glumac B., Asmerom Y., Stroj A., 2011. Evolution of the Veternica cave (Medvednica Mountain, Croatia) drainage system: insights from the distribution and dating of cave deposits. *Geologia Croatica* **3**, 213-221.
- Matjašič J., 1962. Eine neue Hhlenfollikulinide (Euciliata, Heterotricha) aus Herzegowina, *Bioloski vestnik* **10**, 49-53.
- Mulec J., 2008. Microorganisms in hypogean: Examples from Slovenian karst caves, *Acta carsologica* **37**, 153-160.
- Pipan T., 2005. Epikarst – a promising habitat: copepod fauna, its diversity and ecology: a case study from Slovenia (Europe), ZRC Publishing, Ljubljana.
- Ogden C.G., Hedley R.H. 1980. *An Atlas of Freshwater Testate Amoebae*. Oxford Univ. Press, New York.
- Ozimec R., Bedek J., Gottstein Matočec S., Božić V., 2003. Ekološka analiza i inventarizacija faune špilje Veternice u Parku prirode Medvednica : Elaborat, Hrvatsko biospeleološko društvo, Zagreb.
- Sigala-Regalado I., Mayén-Estrada R., Morales-Malacara J.B., 2011. Spatial and temporal distribution of protozoa at Cueva de Los Riscos, Querétaro, México, *Journal of Cave and Karst Studies* **73**, 55-62.
- Sket B., 2004. The cave hygropetric – a little known habitat and its inhabitants, *Archiv für Hydrobiologie* **160**, 413–425.

- Paoletti M.G., Beggio M., Dreon A.L., Pamio A., Gomiero T., Brilli M., Dorigo L., Concheri G., Squartini A., Engel A.S., 2011. A New foodweb based on microbes in calcitic caves: The Cansiliella (Beetles) case in Northern Italy, *International Journal of Speleology*, **40**, 45-52.
- Streble H., Krauter D., 1973. *Das Leben im Wassertropfen. Mikroflora und Mikrofauna des Süßwassers*. Kosmos Gessellschaft der Naturfreunde Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart, 1-429.
- Trček B. 2003. *Epikarst zone and the karst aquifer behaviour : A case study of the Hubelj catchment, Slovenia*, Geološki zavod Slovenije, Ljubljana.
- Van Hengstum P.J., Scott D.B., 2011. Ecology of foraminifera and habitat variability in an underwater cave: distinguishing anchialine versus submarine cave environments, *Journal of Foraminiferal Research* **41**, 201–229.
- Van Hengstum P.J., Reinhardt E.G., Beddows P.A., Schwarcz H.P., Gabriel J.J., 2009. Foraminifera and testate amoebae (thecamoebians) in an anchialine cave: Surface distributions from Aktun Ha (Carwash) cave system, Mexico. *Limnology and Oceanography* **54**, 391-396.
- Vandel A., 1965. *Biospeleology : The Biology of Cavernicolous Animals*, Pergamon press, Oxford.
- Walochnik J., Mulec J., 2009. Free-living Amoebae in carbonate precipitating microhabitats of karst caves and a new vahlkampfiid amoeba, *Allovahlkampfia spelaea* gen. nov., sp. nov., *Acta Protozoologica* **48**, 25-33.

10. Sažetak

Najla Kajtezović

Bioraznolikost praživotinja (Protozoa) u špilji Veternica

Istraživanje praživotinja u špilji Veternica provedeno je od listopada 2011. do travnja 2012. godine s ciljem praćenja prostorno-vremenske rasprostranjenosti i bioraznolikosti praživotinja u špilji Veternica te određivanja ključnih čimbenika koji utječu na populacije praživotinja. Praćeni su hidrometeorološki parametri izvan i unutar špilje te specifični parametri špiljskog staništa. Zabilježeno je četrdeset i sedam svojti praživotinja na tri tipa mikrostaništa: mikrokamenice, lokve u glini i higropetik. Najveća bioraznolikost praživotinja zabilježena je u mikrokamenicama, nešto manja zabilježena je u lokvama u glini dok je najmanja bioraznolikost zabilježena na higropetriku pri čemu je na potonjem staništu prvi puta zabilježenja zajednica praživotinja. Brojem svojti dominirale su okučene amebe, slijede trepetljikaši, bičaši, gole amebe i sunašca. Pronađene ciste ukazuju na postojanje dodatne kriptičke bioraznolikosti. Na bioraznolikost praživotinja u špilji Veternica bitno utječu četiri čimbenika: prisutnost i količina guana, donos hranjivih tvari procjednom vodom, unos aktivnih stadija praživotinja u špilju te unos praživotinjskih cisti.

Ključne riječi: mikrostaništa, guano, okučene amebe, trepetljikaši, kriptična raznolikost.

11. Summary

Najla Kajtezović

Biodiversity of protozoa in Veternica Cave

Protozoa in Veternica Cave were investigated from October 2011 to April 2012 with the aim to observe temporal and spatial distribution and biodiversity of protozoa in Veternica Cave and to determine key factors that influence protozoan populations. The hydrometeorological parameters were measured inside and outside the cave, together with specific cave parameters. Forty seven protozoan taxa were recorded on three types of microhabitats: microcaverns, mud puddles and hygropetricum. The highest biodiversity of protozoa was recorded in the microcaverns, little less in mud puddles, and the lowest biodiversity was measured on hygropetricum. Cave hygropetricum protozoa were firstly mentioned in this research. Testate amoebas dominated with taxa numbers, followed by ciliates, flagellates, naked amoebae and heliozoans. Protozoan cysts imply the existence of additional cryptic biodiversity. Four key factors influence biodiversity of protozoa in Veternica Cave: presence and quantity of bat guano, input of nutrients through percolating water, and input of active stages and cysts of protozoa in the cave.

Key words: microhabitats, guano, testate amoebas, ciliates, cryptic diversity.