

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Marija Vuk

Bioraznolikost i antibiotska rezistencija bakterijskih izolata
Dinarskog krškog podzemlja

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta i na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Ane Bielen i doc. dr. sc. Sandre Hudina i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Geološke značajke Dinarskog krša s naglaskom na podzemlje	2
1.2. Uvjeti života u krškom podzemlju	3
1.3. Životne zajednice Dinarskog krškog podzemlja.....	5
1.3.1. Mikrobne zajednice Dinarskog krškog podzemlja	6
1.4. Razlozi ugroženosti Dinarskog krša	7
1.4.1. Rezistencija na antibiotike kao potencijalni marker antropogenog onečišćenja podzemnih ekosustava.....	8
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	10
3. MATERIJAL I METODE	11
3.1. Markov ponor.....	11
3.2. Uzorkovanje	11
3.3. Uzgoj mikroorganizama	13
3.4. Determinacija izolata MALDI-TOF masenom spektrometrijom.....	14
3.5. Determinacija izolata sekvenciranjem 16S rRNA gena	17
3.5.1. Priprema genomske DNA – kalupa za lančanu reakciju polimerazom..	17
3.5.2. Lančana reakcija polimerazom	18
3.5.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu.....	19
3.5.4. Sekvenciranje i obrada 16S nukleotidnih sekvenci	20
3.5.5. Filogenetska analiza	21
3.6. Određivanje rezistencije izolata na različite klase antibiotika	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Usporedba molekularnih metoda za taksonomsku determinaciju izolata	23
4.2. Banka bakterijskih izolata Markovog ponora	25
4.3. Ovisnost sastava bakterijskih zajednica o količini vode.....	30
4.4. Rezistencija na antibiotike u krškom podzemlju	31

5. RASPRAVA.....	35
5.1. Primjena MALDI-TOF MS u okolišnoj mikrobiologiji	35
5.2. Uzgojive bakterije Markovog ponora	36
5.3. Voda kao dominantni ekološki faktor u Dinarskom krškom podzemlju	38
5.4. Rezistencija na antibiotike prisutna je u podzemnom staništu bez značajnog antropogenog utjecaja	39
6. ZAKLJUČCI.....	41
7. ZAHVALE	43
8. POPIS LITERATURE	44
9. SAŽETAK	52
10. SUMMARY	53

1. UVOD

Dinarski krš je jedinstveno i specifično područje koje se proteže duž jugozapadne Slovenije, zapadne i južne Hrvatske, zapadne Bosne, Hercegovine, cjelokupne Crne Gore i sjevernog dijela Albanije (**Slika 1.**). Čak 46% površine Hrvatske je krško područje (Gottstein, 2010). Dinarski krš ima veliku vrijednost u svjetskim razmjerima jer predstavlja klasični tip krša (lat. *locus tipicus*). Prvi je istražen sustav tog tipa u svijetu i idealan primjer krša jer se odlikuje čitavim rasponom unutrašnjih i vanjskih krških reljefnih oblika. Ujedno je i prostor gdje su razvijene prve teorije o cirkulaciji vode u krškim prostorima. Zanimljivo je da naziv *karst* (engl.) ima slavensko porijeklo odnosno potječe upravo iz područja Dinarskog krša. Čak se i pojmovi koji predstavljaju krške reljefne oblike poput polja i ponora prevode *poljas* i *ponors* (engl.) (Ford i Williams, 2007).



Slika 1. Područje rasprostiranja Dinarskog krša (sivo) s označenom lokacijom Markovog ponora, Lipovo polje. Karta je preuzeta iz rada Bilandžija i sur. (2013) i prilagođena.

Osim toga, ovo se područje odlikuje velikom biološkom raznolikošću te je prepoznato kao vruća točka (engl. *hot spot*) europske bioraznolikosti. Osobito je bogato endemičnim i tercijskim reliktnim vrstama, što pokazuju i brojni noviji znanstveni radovi (Gaston i David, 1994; Sket, 1999; Culver i Sket, 2000; Bilandžija i sur., 2013; Andersen i sur., 2016; Vörös i sur., 2017).

1.1. Geološke značajke Dinarskog krša s naglaskom na podzemlje

Krš je jedinstveni tip reljefa prožet opsežnim podzemnim sustavima kojeg najvećim dijelom grade sedimentne biogene stijene vapnenac i dolomit. Jedno od značajnih obilježja Dinarskog krša je velika poroznost, odnosno visok postotak šupljina u ukupnom volumenu stijenske mase. Izražena osobina vapnenca je topivost pa je krški reljef, uz tektonske pomake, značajno oblikovan djelovanjem vode. Voda obogaćena ugljičnim dioksidom otapa karbonate (krški ili disolucijski tip poroznosti) i tako proširuje ranije nastale tektonske deformacije i pukotine u stijenama. Za ovo područje značajni su endokrški oblici koji nastaju mehaničkim djelovanjem podzemnih tekućica i urušavanjem. Oblici sa strmim vertikalnim kanalima uskog otvora nazivaju se jamama, a jame u kojima se gube površinske tekućice su ponori koji su česti oblik u dubokom kršu. Špilje su endokrški oblici koji imaju horizontalne ili blago nagnute kanale ($<45^\circ$). Kaverne su, poput špilja i jama, podzemne šupljine u kršu, ali za razliku od njih one nemaju ulaz (Ford i Williams, 2007).

Upravo zahvaljujući tako nastalim endokrškim reljefnim oblicima, tj. oblicima koji nastaju ispod površine poniranjem i prolaskom vode, u Dinarskom je kršu vrlo dobro razvijena podzemna cirkulacija vode. Voda protiče velikom brzinom kroz provodnike većih dimenzija, a polako kroz sitne pukotine i pore. Podzemni krški vodonosnici dio su kompleksnog krškog sustava te je vrlo teško predvidjeti smjer i vrijeme putovanja podzemne vode u njima, a s njom i transport zagađenja. Ovo je vrlo bitno jer 20-25% svjetske populacije u velikoj mjeri ili u potpunosti ovisi upravo o podzemnim vodama koje se crpe iz tih sustava. Voda kao resurs je pod pritiskom koji se svakim danom povećava stoga postoji ogromna potreba za rehabilitacijom i kvalitetnim održivim upravljanjem vodnim resursima (Ford i Williams, 2007).

Kako je već navedeno, iznimno velika površina Hrvatske je pod kršem pa obiluje podzemnim krškim objektima koji su većinom neistraženi. Krški vodonosnici jedan su od najvažnijih prirodnih resursa Hrvatske (Biondić i Biondić, 2014). Kako bi se zaštitili krški izvori pitke vode neophodna su daljnja i sustavna istraživanja krškog podzemlja.

1.2. Uvjeti života u krškom podzemlju

Špilje i jame su staništa u kojima pretežito vladaju stabilni ekološki uvjeti. Prvenstveno se radi o potpunom nedostatku svjetla (**Slika 2.**), što ima značajne posljedice na živi svijet. Podzemne životinje nemaju oči ili su im one vrlo reducirane te su većinom svijetlo obojene (redukcija pigmentacije). Nasuprot tome, osjet mirisa i dodira im je izuzetno razvijen, što se često očituje u vidu jako produženih ticala i nogu koje nose dodatne osjetilne dlačice. Osim toga, nedostatak svjetla ima za posljedicu i nepostojanje fotosinteze i općenito primarnih proizvođača (biljaka, algi i fotoautotrofnih bakterija). Stoga podzemni organizmi ovise o dotoku hrane s površine procjednom vodom i podzemnim tekućicama koje potječu od površinskih i sezonski plave podzemne prostore. Općenito, količina dostupnih hranjivih tvari u podzemlju je vrlo niska, ali se može naglo povećati za vrijeme proljetnog poplavlivanja (Culver i Pipan, 2009). Kao prilagodbu na oligotrofno stanište, podzemne životinje često imaju vrlo usporen metabolizam, odnosno mogu preživjeti dugo vrijeme bez hrane (Sket, 2005).

U podzemnim staništima okolišni čimbenici variraju puno manje nego na površini, a to se posebno odnosi na temperaturu (Culver i Pipan, 2009). Primjerice, mikroklimatska analiza Markovog i Dankovog ponora, dinarskih krških podzemnih ekosustava na području Lipovog polja i ponorne zone rijeke Like, pokazala je niske i relativno stabilne temperature u dubljim dijelovima ponora. Temperatura zraka u ovim špiljskim staništima iznosi između 6,2 i 9,9° C (raspon 3,7° C), supstrata od 5,9 do 8,4° C (raspon 2,5° C) te vode od 7,8 do 9,1° C (raspon 1,3° C). U usporedbi s tim, prosječne nadzemne temperature zraka u Gospiću (meteorološka postaja najbliža Kosinjskom i Lipovom polju) za razdoblje 1971.-2000. godine iznosile su -0,8° C u siječnju, a 18,5° C u srpnju. Najviša zabilježena temperatura u istom razdoblju iznosila je 37,0° C u srpnju, a najniža je bila -27,3° C u siječnju (OIKON i Elektroprojekt, 2016).



Slika 2. Potpuni nedostatak svjetla u jami Markov ponor. (Foto: Basara D.)

Osim temperature, ostali parametri važni za živi svijet krškog podzemlja uključuju zračne struje, razinu vode i relativnu vlažnost zraka. Zrak je u potpunosti zasićen vlagom (relativna vlažnost zraka kontinuirano blizu 100%). U nekim podzemnim prostorima, poput Markovog i Dankovog ponora, povremeno dolazi do strujanja zraka na ulaznim dijelovima ponora (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

Jedini ekološki parametar koji značajno varira u krškom podzemlju jest razina vode. Podzemne tekućice tijekom razdoblja niskih razina vode imaju tendenciju poprimiti značajke podzemne stajaćice. Fluktuacije razine vode mogu se ilustrirati na primjeru jame Markov ponor koja se nalazi u Lipovom polju (**Slika 1.**). Voda se u sifone tog ponora puni poniranjem rijeke Like te infiltracijom oborina na krškom planinskom području smještenom između doline Kosinjskog Bakovca i Lipovog polja. Razina podzemne vode u Markovom ponoru kroz godinu može varirati i za više od 50 m, a u određenim dijelovima godine kada je najveći dotok riječne vode, ponor postaje velikim dijelom ispunjen vodom i stoga potpuno neprohodan (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

1.3. Životne zajednice Dinarskog krškog podzemlja

Kako je ranije spomenuto, podzemna staništa uglavnom su trofički ovisna o površinskim ekosustavima pa stoga spadaju u ekstremna staništa. Konstantnost abiotičkih čimbenika čini podzemna staništa i njihovu faunu među najranjivijima na svijetu (Wilkins, Culver i Humphreys, 2001).

Faunu Dinarskog krša, uključujući Hrvatsku, odlikuje najveća špiljska bioraznolikost na svijetu, uz mnoštvo endemičnih i reliktnih svojti (Culver i Sket, 2000; Ozimec i sur., 2009). U Hrvatskoj je do danas utvrđeno preko 500 pravih špiljskih svojti (Ozimec i sur., 2009), među kojima dominiraju redom kukci, paučnjaci, rakovi, puževi i stonoge. Većina vrsta su endemične za Dinaride, a čak 80% za Hrvatsku. Špiljska fauna Hrvatske još je uvijek relativno slabo istražena, kontinuirano se otkrivaju nove špilje i jame s jedinstvenom faunom te se očekuje opisivanje većeg broja za znanost novih vrsta. Osim toga, mnoge vrste špiljske faune su ugrožene pa Crveni popis špiljske faune Hrvatske obuhvaća 186 svojti, od kojih je čak 35% kritično ugroženo (Bedek i sur., 2006). Posebnost i vrijednost špiljske faune Dinarskog krša može se ilustrirati na primjeru Markovog i Dankovog ponora, u kojima su zabilježene mnoge rijetke i ugrožene vrste beskralježnjaka, poput ogulinske špiljske spužvice (*Eunapius subterraneus* Sket & Velikonja, 1984) i dinarskog špiljskog cjevaša (*Marifugia cavatica* Absolon & Hrabe 1930). Među njima se posebno ističe rod *Congerina* – jedini rod podzemnih školjkaša na svijetu čije sve tri do sada opisane vrste žive upravo na području Dinarskog krša. Sjeverni dinarski špiljski školjkaš (*Congerina jalzici* Morton & Bilandžija, 2013) (**Sluke 3. i 6.**) nedavno je opisana vrsta koja je do sada pronađena jedino u ovom području (Bilandžija i sur., 2013) i zbog koje je ono uvršteno u ekološku mrežu Europske unije Natura 2000 (OIKON i Elektroprojekt, 2016).

Najveći dio istraživanja podzemlja Dinarskog krša fokusiran je na njegov geološki aspekt te s biološkog pretežito na podzemne beskralježnjake (Biondić i Biondić, 2014; Andersen i sur., 2016; Jovanović Glavaš, Jalžić i Bilandžija, 2017). Nasuprot tome, mikrobne zajednice mnogo su slabije istražene iako mikrobi čine osnovu svih hranidbenih mreža u podzemlju. Mikrobi koji se hrane detritusom i najvećim dijelom tvore biofilmove na površini stijena uz fini sediment predstavljaju najvažniji izvor hrane za podzemne životinje, dok organska tvar koja dolazi s

površine u otopljenom ili čestičnom obliku (komadići listova, drva i guano šišmiša) ima manji značaj (Simon, 2008). Stoga je poznavanje sastava i raznolikosti mikrobnih biofilmova ključno za razumijevanje i analizu sastava podzemnih životnih zajednica u kršu.



Slika 3. Nanosi ljuštura dinarskih špiljskih školjkaša u Markovom ponoru. (Foto: Radić I.)

1.3.1. Mikrobne zajednice Dinarskog krškog podzemlja

U podzemlju se u različitim tipovima staništa (voda, površina stijena, sediment, guano itd.) mogu naći različiti mikrobi: bakterije, gljive, alge i praživotinje (Mulec, 2008). Obraštajne mikrobne zajednice predstavljaju izvor energije za više oblike života, pogotovo u staništima bez svjetlosti/fotosinteze (Barton, 2006). Postojeće studije špiljskih mikrobnih zajednica Dinarskog krša većinom su se bavile istraživanjem sastava uzgojivih bakterija s površine stijena i vezane su za područje Slovenije (Velikonja, Tkavc i Pašić, 2014; Mulec i sur., 2015).

Među različitim mikrobnim zajednicama u podzemlju posebno su zanimljive i neistražene epibiontske mikrobne zajednice na špiljskim beskralježnjacima koje mogu biti korisne za domaćina osiguravajući mu dodatni izvor hrane. Primjerice, u karbonatnim špiljama Frasassi u Italiji pronađen je simbiotski odnos između kemolitotrofne epibiontske bakterije iz roda *Thiothrix* i endemskog makrobekralježnjaka *Niphargus ictus* (Dattagupta i sur., 2009). Ne postoje slična istraživanja za područje Dinarskog krša.

1.4. Razlozi ugroženosti Dinarskog krša

Antropogeni utjecaj predstavlja glavnu prijetnju jedinstvenom ekosustavu Dinarskog krša. Endokrški i egzokrški reljefni oblici uništavaju se prvenstveno fizičkom devastacijom staništa odnosno izgradnjom prometnica, kamenoloma, tunela i sl. Dodatni problem predstavlja onečišćenje otpadnim vodama, raznim kemikalijama i teškim metalima te neadekvatno odlaganje otpada (**Slika 4.**). Osim toga, špilje Dinarskog krša ugrožava i neprikladno turističko korištenje kao i globalna promjena klime (Ozimec i sur., 2009; Bilandžija, Čuković i Puljas, 2014).

Zbog gore opisane geološke, hidrološke i biološke vrijednosti krškog podzemlja, speleološki objekti su od posebnog interesa za Republiku Hrvatsku i uživaju njenu osobnu zaštitu (Zakon o zaštiti prirode, NN 80/13). Isto tako, špiljska staništa i podzemna fauna strogo su zaštićeni. Stoga je neophodno provoditi sustavna istraživanja i kontinuirani monitoring netaknutih krških staništa kako bi se što ranije mogle uočiti promjene koje ukazuju na negativne antropogene utjecaje.



Slika 4. Neadekvatno odlaganje otpada (preuzeto s <http://cistopodzemlje.info>). (Foto: Rnjak G.)

1.4.1. Rezistencija na antibiotike kao potencijalni marker antropogenog onečišćenja podzemnih ekosustava

Poznato je da se sastav i funkcija mikrobnih zajednica brzo mijenja u okolišima koji su izloženi negativnim antropogenim utjecajima poput zagađenja (Bissett i sur., 2013; Patel i sur., 2014; Poulain i sur., 2015). Primjerice, u slučaju zagađenja okoliša antibioticima, posebice u niskim koncentracijama, javlja se selektivni pritisak koji aktivira horizontalni prijenos gena među bakterijama te dolazi do širenja gena za rezistenciju među njima. Bakterije sa stečenom rezistencijom na antibiotike pokazuju bolju kondiciju (tj. bolju sposobnost preživljavanja i dijeljenja u usporedbi s bakterijama bez stečene rezistencije) te tako postaju dominantnije u zajednici (Martinez, 2009; Andersson i Hughes, 2014). Razvoj i širenje antibiotičke rezistencije među okolišnim i patogenim bakterijama smatra se univerzalnom prijetnjom za zdravlje ljudi i okoliša (Vaz-Moreira, Nunes i Manaia, 2014). Upotreba antibiotika je u moderno doba vrlo raširena, kako u terapijske svrhe, tako i u uzgoju životinja i poljoprivredi, pa je i zagađenje okoliša niskim koncentracijama antibiotika u porastu (Martinez, 2009; Andersson i Hughes, 2014).

Neke novije studije su ukazale na povezanost između gena odgovornih za rezistenciju na antibiotike i antropogenih promjena u staništu, čineći ih potencijalnim markerom antropogenog zagađenja (Knapp i sur., 2010; Woegerbauer i sur., 2015; Gillings i sur., 2015). Primjerice, kod suvremenog tla je zabilježen značajno veći broj gena za rezistenciju na neke antibiotike (β -laktami, tetraciklini i makrolidi) nego kod tla koje potječe iz doba prije masovne produkcije antibiotika (Knapp i sur., 2010). S druge strane, antibiotska rezistencija je prirodna osobina bakterija pa se javlja i u okolišima koji nisu izloženi antropogenom utjecaju, poput tla na Aljasci ili izolirane špilje u Novom Meksiku (Allen i sur., 2009; Bhullar i sur., 2012). Stoga zagađenje antibioticima odnosno antropogeni utjecaj najvjerojatnije nije jedini uzrok pojave rezistencije na njih u mikrobnim zajednicama. Primjerice, okoliš može sadržavati prirodne izvore antibiotika, poput raznih sojeva gljiva i bakterija koje se normalno javljaju u svim ekosustavima (Martin i Liras, 1989).

Istraživanje rezistencije u okolišnim mikrobnim zajednicama relativno izoliranim od antropogenog utjecaja, poput podzemnih ekosustava, neophodna je kako kako bi se donijeli zaključci o nivou prirodne rezistencije u okolišu odnosno kako bi se razlučilo koji udio rezistencije je normalan, a koji povišen (odnosno da li su određeni izolirani krški podzemni ekosustavi pod antropogenim pritiskom, tj. izloženi indirektnom ili direktnom zagađenju putem površinskih voda).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

S obzirom na opisanu izuzetno važnost Dinarskog krša te slabu istraženost i poznavanje sastava zajednica mikrobnih biofilmova kao osnove svih hranidbenih mreža u podzemlju, cilj ovoga rada bio je po prvi put karakterizirati bakterijske obraštajne zajednice Markovog ponora. Lokalitet Markov ponor je primjer očuvanog i nezagađenog podzemnog staništa u Dinarskom kršu te dio ekološke mreže HR2001012 Ličko polje (OIKON i Elektroprojekt, 2016). Također, cilj rada je bio po prvi puta u Dinarskom kršu utvrditi antibiotsku rezistenciju mikrobnih zajednica u sustavu koji je izoliran od antropogenog utjecaja. Ovakvo istraživanje izuzetno je važno kako bi se utvrdila prirodna rezistencija u podzemnom okolišu i kako bi se mogli donijeti zaključci koji udio rezistencije je normalan, a koji povišen (odnosno rezultat antropogenog utjecaja).

Specifični ciljevi bili su:

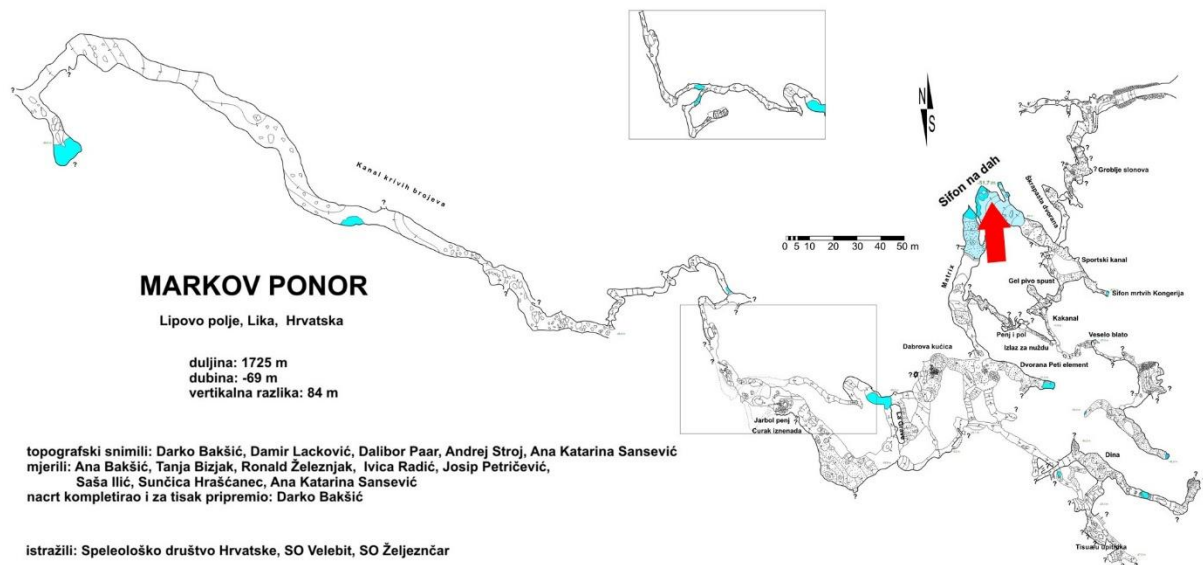
1. izraditi prvu banku bakterijskih izolata Markovog ponora,
2. taksonomski identificirati izolate MALDI-TOF MS-om (MALDI-TOF MS, engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry*) i određivanjem slijeda nukleotida gena za 16S rRNA te usporediti korištene determinacijske metode,
3. istražiti ovisnost sastava bakterijskih zajednica o količini vode, kao jedinog varijabilnog ekološkog čimbenika, u staništu
4. ispitati rezistenciju izolata na osam različitih klasa antibiotika.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Markov ponor

Markov ponor (**Slika 5.**), Lipovo polje, najznačajniji je ponor rijeke Like pogodan za speleološka istraživanja. Lipovo polje se nalazi na području dubokog krša Vanjskih Dinarida, a rijeka Lika je jedini stalan vodotok na ovom području. Njezino ponorno područje je izvanredno povoljno za razvoj speleoloških objekata radi koncentrirane infiltracije velikih količina vode.

Markov ponor je izrazito razveden i u njemu je istraženo više od 2000 metara špiljskih kanala (OIKON i Elektroprojekt, 2016). Markov ponor uz još 5 speleoloških objekata nalazi se unutar ekološke mreže (HR2001012 Ličko polje) koja predstavlja dio sustava zaštite prirode Europske unije i koju čine područja očuvanja značajna za ptice i područja očuvanja značajna za vrste i stanišne tipove. Stanišni tip 8310 Špilje i jame zatvorene za javnost je jedan od razloga proglašavanja i zaštite ovog područja ekološke mreže (OIKON i Elektroprojekt, 2016).



Slika 5. Tlocrt Markovog ponora s istaknutom lokacijom uzorkovanja (preuzeto s <http://speleologija.eu/markovponor/>). Crvena strelica označava mjesto uzorkovanja.

3.2. Uzorkovanje

Uzorkovanje obraštajnih mikrobnih zajednica Markovog ponora provedeno je 1. listopada 2016. godine na lokaciji označenoj na **Slici 5.** Uzorkovanje je provedeno

na način da se dobije što veći broj različitih bakterijskih izolata, odnosno što veća bioraznolikost. Stoga su sa površine ljuštura sjevernih dinarskih špiljskih školjkaša, *Congeria jalzici* (**Slika 6.**), sterilnim štapićima za uzimanje briseva (Hospitalija) uzeti obrisci obraštajnih bakterija. Kolonije špiljskih školjkaša iz roda *Congeria* predstavljaju mikrostaništa s povišenom količinom hranjivih tvari u inače oligotrofnom podzemnom staništu pa je pretpostavljeno da se na ljušturama školjkaša nalaze raznolikije obraštajne bakterijske zajednice nego na okolnim stijenama (Gillan i De Ridder, 1997). Špiljski školjkaši iz roda *Congeria* vrlo su dugovječne životinje koje žive pričvršćene bisusnim nitima za stijene te se hrane filtriranjem sitnih organskih čestica u vodi (Morton, Velkovich i Sket, 1998). Povećan protok vode zbog filtracije, izmet školjkaša kao i uginule životinje izvor su organske tvari koji omogućuje rast heterotrofnih bakterija.



Slika 6. *Congeria jalzici* Morton & Bilandžija, 2013. (Foto: Roman Ozimec)

Nadalje, uzorkovanje je provedeno na tri različita mikrostaništa koja su se razlikovala prema količini vode: (1) kongerije na zraku, (2) kongerije na špiljskom higrometriku, posebnom staništu na kojemu preko zidova bez prestanka teče tanak sloj vode (Gottstein Matočec i sur., 2002), (3) kongerije koje su izvađene iz vode. Razlog tome su oscilacije razine vode koje predstavljaju dominantni ekološki čimbenik za podzemne mikrobne zajednice, obzirom da su ostali okolišni čimbenici većim dijelom konstantni, pa obuhvaćanje navedena tri mikrostaništa pruža mogućnost pronalaska veće raznolikosti mikrobnih zajednica.


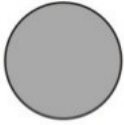
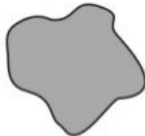






















Za svako mikrostanište je uzorkovan obrisak s 10 jedinki kongerija. Uzorkovani brisevi su na ledu i u mraku odmah transportirani do laboratorija, gdje su nasađeni na krute hranjive podloge.

3.3. Uzgoj mikroorganizama

Za uzgoj mikroorganizama korištena je neselektivna kruta hranjiva podloga Tryptic Soy Agar (TSA, Biolife). Hranjiva podloga sterilizirana je u autoklavu pri temperaturi od 121° C i tlaku od 2 atm u trajanju od 25 minuta.

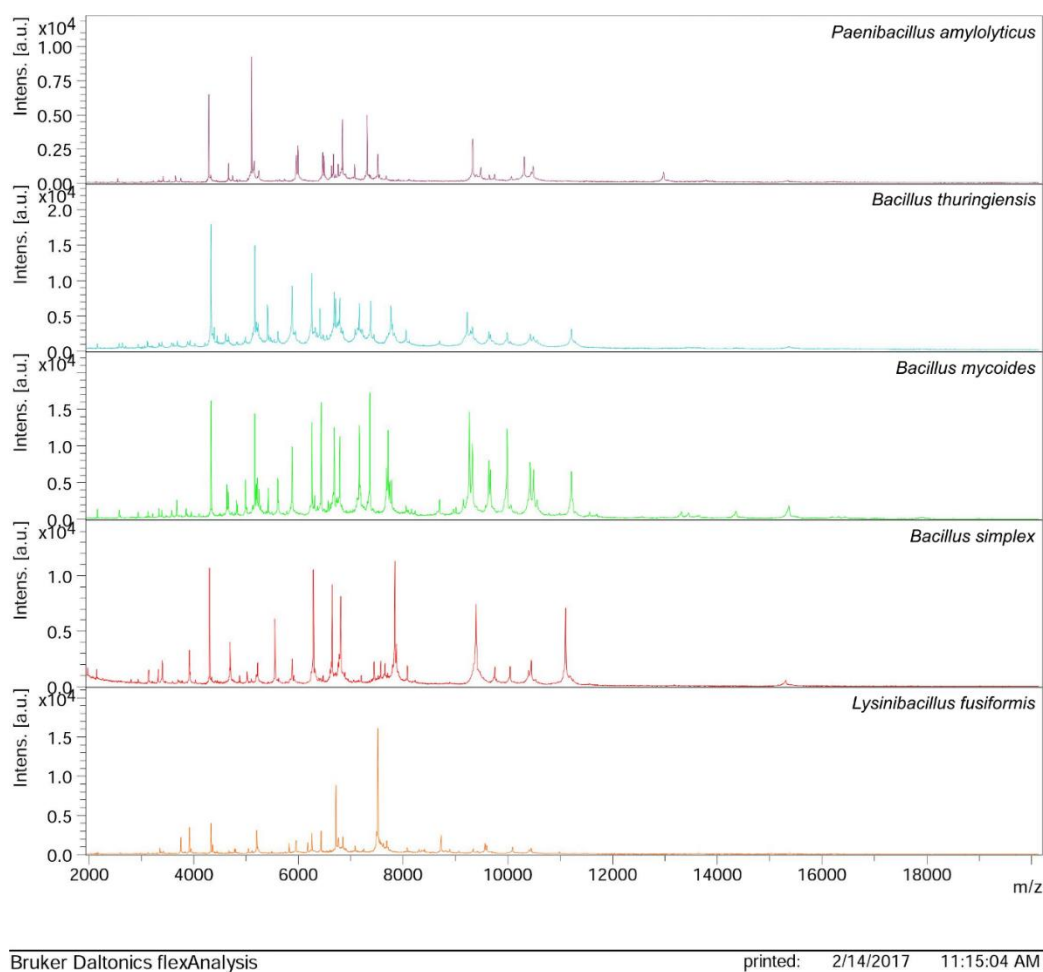
Obrisci su nasađeni na krute hranjive podloge i inkubirani pri 21 °C. Nakon 7 dana iz izraslih mješovitih kultura sa svake ploče izabrano je do 10 morfološki različitih pojedinačnih kolonija te su zasebno presađene i uzgojene pri 21 °C kroz 3 dana. Svaki izolat je detaljno morfološki opisan prema kriterijima navedenim u **Tablici 1.**, dodijeljena mu je oznaka te je pohranjen u 1 mL 20% glicerola (GRAM-MOL) pri -20° C.

Tablica 1. Morfološki kriteriji za opis bakterijskih izolata (preuzeto i prilagođeno s http://ttktamop.elte.hu/online-tananyagok/practical_microbiology/ch06s04.html).

Oblik:						
	točkasti	kružni	nepravilni	vlaknasti	rizoidni	vretenasti
Profil:						
	ravan	povišen	konveksan	jastučast	ispupčen	udubljen
Tlocrt:						
	cjelovit		valovit	latičast	vlaknast	
Površina:						
	glatka	svjetlacava	hrapava	mat	naborana	
Konzistencija:						
	poput maslaca		ljepljiva	krta	mukozna	

3.4. Determinacija izolata MALDI-TOF masenom spektrometrijom

MALDI-TOF masena spektrometrija je vrlo brza i pouzdana metoda za taksonomsku determinaciju pojedinačnih bakterijskih kolonija (Topić Popović i sur., 2016). Općenito, masenom se spektrometrijom ioni razdvajaju na osnovi specifičnih omjera mase i naboja te se tako mogu identificirati različite tvari. MALDI-TOF MS detektira signale ribosomskih proteina bakterija koji su specifični za određenu vrstu ili rod (Lay, 2001). Komercijalni maseni spektrometri opremljeni su bazama prikupljenih spektara sadržavajući i do 2000 vrsta s preko 3000 snimljenih spektara (Lavigne i sur., 2013). Dobiveni spektri nepoznatih izolata (**Slika 7.**) uspoređuju se sa spektrima poznatih bakterijskih vrsta iz baze i ukoliko dođe do podudaranja spektara može se utvrditi da se radi o određenoj bakterijskoj vrsti ili rodu.



Slika 7. Primjeri masenih spektara mikrobnih izolata iz ovog rada.

Uzorci za MALDI TOF MS analizu pripremljeni su ekstrakcijom etanolom i mravljom kiselinom, prema ranije opisanom protokolu (Topić Popović i sur., 2015). Ukratko, pojedinačna svježa bakterijska kolonija je sterilnom čačkalicom resuspendirana u 100 μ L 75% etanola (GRAM-MOL) i centrifugirana pri 13000 x g kroz 2 min (Centrifuga Centric 200R, Domel). Nakon uklanjanja supernatanta, talog je resuspendiran u 5 μ L 70% mravlje kiseline (Fisher Chemical), zatim je dodan jednaki volumen acetonitrila (Fisher Chemical). Nakon centrifugiranja pri 13000 x g kroz 2 min, 1 μ L supernatanta je nanešen na pločicu za MALDI TOF MS i ostavljen da se osuši na zraku pri sobnoj temperaturi. Na svaki uzorak je dodan 1 μ L MALDI matrice (10 mg/mL alfa-cijano-4-hidroksicimetne kiseline u 50% acetonitrilu i 2,5% trifluoroctenoj kiseline, Bruker Daltonik GmbH). Nakon još jednog sušenja pločice na zraku, Microflex LT MALDI TOF spektrometrom masa (Bruker Daltonics) Instituta

Ruđer Bošković snimljeni su spektri svakog uzorka. Uređaj je korišten prema uputama proizvođača, u rasponu masa od 2000–20000 Da. Snimljeni maseni spektri obrađeni su MALDI Biotyper 3.0 softverom (Bruker Daltonics) te je maseni spektar svakog izolata uspoređen s referentnim spektrima iz baze. Ovisno o tome koliko je spektar izolata sličan određenom referentnom spektru, svakom paru spektara dodijeljena je vrijednost u rasponu od 0,000 do 2,300 temeljem koje se može procijeniti vjerojatnost točne identifikacije izolata (**Tablica 2.**).

Tablica 2. Tumačenje dodijeljenih vrijednosti u svrhu determinacije izolata.

Vrijednost	Značenje vrijednosti	Oznaka
2,300-3,000	visoka vjerojatnost determinacije vrste	(+++)
2,000-2,299	determinacija roda, vjerojatna determinacija vrste	(++)
1,700-1,999	vjerojatna determinacija roda	(+)
0,000-1,699	nepouzdana determinacija	(-)

Konačni rezultat i procjena pouzdanosti MALDI TOF MS determinacije dobiven je na temelju podudaranja i odnosa najbolje rangiranih rezultata. Svakom je izolatu dodijeljena kategorija pouzdanosti rezultata A, B ili C. Kategorija A upućuje da je izolat točno određen do razine vrste. Dodjeljuje se u slučaju kada najbolje rangirana vrsta ima rezultat između 2,000 i 3,000 (++ ili +++, „zelena“ vrijednost). Daljnje „zelene“ vrijednosti moraju biti ista vrsta ili ako su „žute“, onda moraju biti barem isti rod (**Slika 8.**, primjer (++) A). Kategorija B upućuje da je izolat točno određen do razine roda. Dodjeljuje se u slučaju kada najbolje rangirana vrsta ima rezultat „zelene“ vrijednosti, a uvjeti za kategoriju A nisu zadovoljeni. Primjerice, za prva dva "zelena" rezultata se ne podudara vrsta pa se izolat ne može odrediti do vrste već samo do roda (**Slika 8.**, primjer (++) B). Kategorija C upućuje na nepouzdan rezultat, jer se uzastopni rezultati ne podudaraju ni prema vrsti ni prema rodu.

(++) A

Rank(Quality)	Matched Pattern	ScoreValue
1(++)	Pseudomonas gessardii CIP 105469T HAM	2.121
2(+)	Pseudomonas libanensis CIP 105460T HAM	1.954
3(+)	Pseudomonas mandelii CIP 105273T HAM	1.946
4(+)	Pseudomonas breneri CIP 106646T HAM	1.896
5(+)	Pseudomonas rhodesiae DSM 14020T HAM	1.875

(++) B

Rank(Quality)	Matched Pattern	ScoreValue
1(++)	Bacillus altitudinis CS 809_1 BRB	2.072
2(++)	Bacillus pumilus DSM 13835 DSM	2.063
3(+)	Bacillus pumilus DSM 27T DSM	1.975
4(+)	Bacillus altitudinis CS 542_4 BRB	1.914
5(-)	Bacillus pumilus DSM 1794 DSM	1.68

Slika 8. Primjeri rezultata MALDI TOF MS determinacije. U gornjoj tablici rezultati upućuju da se radi o vrsti *Pseudomonas gessardii* (kategorija pouzdanosti A), a u donjoj tablici rezultat je pouzdan do roda *Bacillus* sp. (kategorija pouzdanosti B).

3.5. Determinacija izolata sekvenciranjem 16S rRNA gena

Determinacija izolata sekvenciranjem 16S rRNA gena provodi se tako da se lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) umnoži fragment gena koji kodira za 16S rRNA, dobivenom DNA fragmentu se sekvenciranjem odredi slijed nukleotida te se dobiveni nukleotidni slijed usporedi sa nukleotidnim slijedovima poznatih mikroorganizama u javno-dostupnim bazama podataka.

3.5.1. Priprema genomske DNA – kalupa za lančanu reakciju polimerazom

Genomska DNA najvećeg dijela bakterijskih izolata pripremljena je tako da je vrlo mala količina pojedinačne kolonije sterilnom čačalicom prebačena u 200 μ L deionizirane vode (Lonza) te termički tretirana pri 95° C kroz 15 minuta kako bi došlo do razaranja stanica i izlaska DNA u otopinu. Ovakva “nečista” otopina DNA je u

većini slučajeva bila dovoljno dobar kalup za PCR reakciju, a vrijeme trajanja i trošak pokusa su puno manji nego kada se DNA kalup iz bakterijske biomase izolira klasičnim kompletima (Dashti i sur., 2009).

U nekoliko slučajeva gore navedeni način pripreme genomske DNA nije bio zadovoljavajuć, odnosno naknadno PCR-umnažanje fragmenta gena koji kodira za 16S rRNA nije bilo uspješno, vjerojatno zbog prisustva inhibitora u otopini. U tim je slučajevima genomska DNA izolirana kompletom NucleoSpin® Microbial DNA (Macherey Nagel) prema uputama proizvođača. U navedenim slučajevima. DNA iz stanica je „oslobođena“ mehaničkom disrupcijom bakterijskih stanica na uređaju TissueLyser (Qiagen) 12 min pri 30 Hz.

3.5.2. Lančana reakcija polimerazom

Umnažanje 16S-rDNA sekvence (dužine 1465 bp) provedeno je lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction* –PCR). PCR je metoda *in vitro* umnažanja određenog DNA fragmenta u nekoliko ciklusa koji uključuju denaturaciju kalupa DNA, specifično vezanje oligonukleotidnih početnica na jednolančane DNA i sintezu komplementarnih lanaca DNA.

Sastav reakcijske smjese za PCR naveden je u **Tablici 4**. PCR reakcija provedena je u uređaju Alpha Cyclor 1 (PCRmax) prema programu navedenom u **Tablici 5**. Korištene oligonukleotidne početnice (**Tablica 3.**) bile su uzvodna 27F i nizvodna 1492R (Lane, 1991).

Tablica 3. Nukleotidni slijedovi korištenih početnica.

Počelnica	Nukleotidni slijed 5'-3'
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za PCR.

DNA kalup	1 - 4 μL
EmeraldAmp® PCR 2X Master Mix (TAKARA)	12,5 μL
10 μM uzvodna početnica 27F*	0,5 μL
10 μM nizvodna početnica 1492R*	0,5 μL
dH ₂ O	do ukupnog volumena 25 μL

* Konačna koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi bila je 0.2 μM .

Tablica 5. Dijelovi lančane reakcije polimerazom.

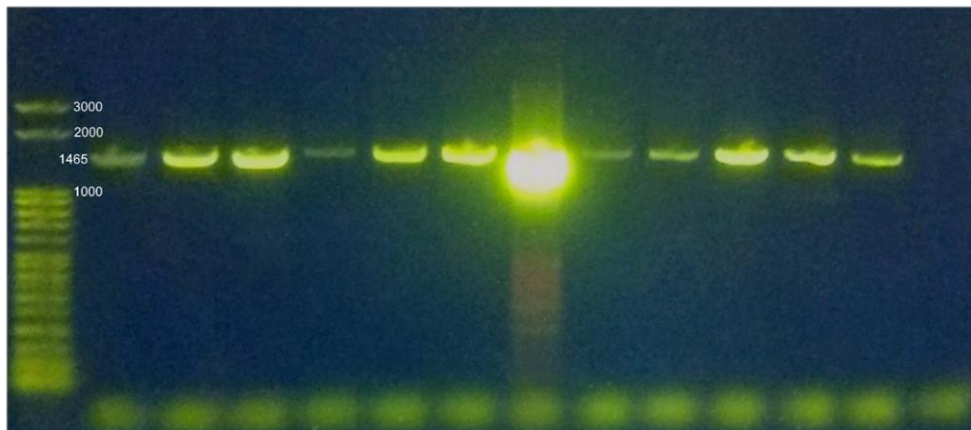
		Vrijeme	Temperatura
28 ciklusa	Početna denaturacija	5 min	95° C
	Denaturacija lanaca	1 min	94° C
	Vežanje početnica za kalup	1 min	55° C
	Sinteza komplementarnih lanaca	1,5 min	72° C
	Završno produživanje lanaca	10 min	72° C

Za negativnu kontrolu u reakcijsku smjesu dodan je 1 μL dH₂O umjesto DNA kalupa.

3.5.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu je metoda razdvajanja fragmenata nukleinskih kiselina prema veličini pod utjecajem istosmjernog električnog polja, pri čemu se kraći DNA fragmenti kreću brže od dužih (Lee i sur., 2012). U ovom je radu elektroforeza u 1%-tnom agaroznom gelu korištena za provjeru uspješnosti PCR reakcije, odnosno amplifikacije fragmenta gena za 16S rRNA. Agaroz (Sigma-Aldrich) otopljen je u TAE puferu (40 mM Tris; 20 mM octena kiselina; 1mM EDTA) te joj je dodana boja GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza) za vizualizaciju DNA fragmenata, prema uputama proizvođača. DNA molekule razdvojene su u električnom polju napona 100 V u TAE puferu kroz 45 minuta te nakon toga vizualizirane pod UV-svjetlom (UVIpure, UVITEC Cambridge) i fotografirane. Za provjeru veličine dobivenog

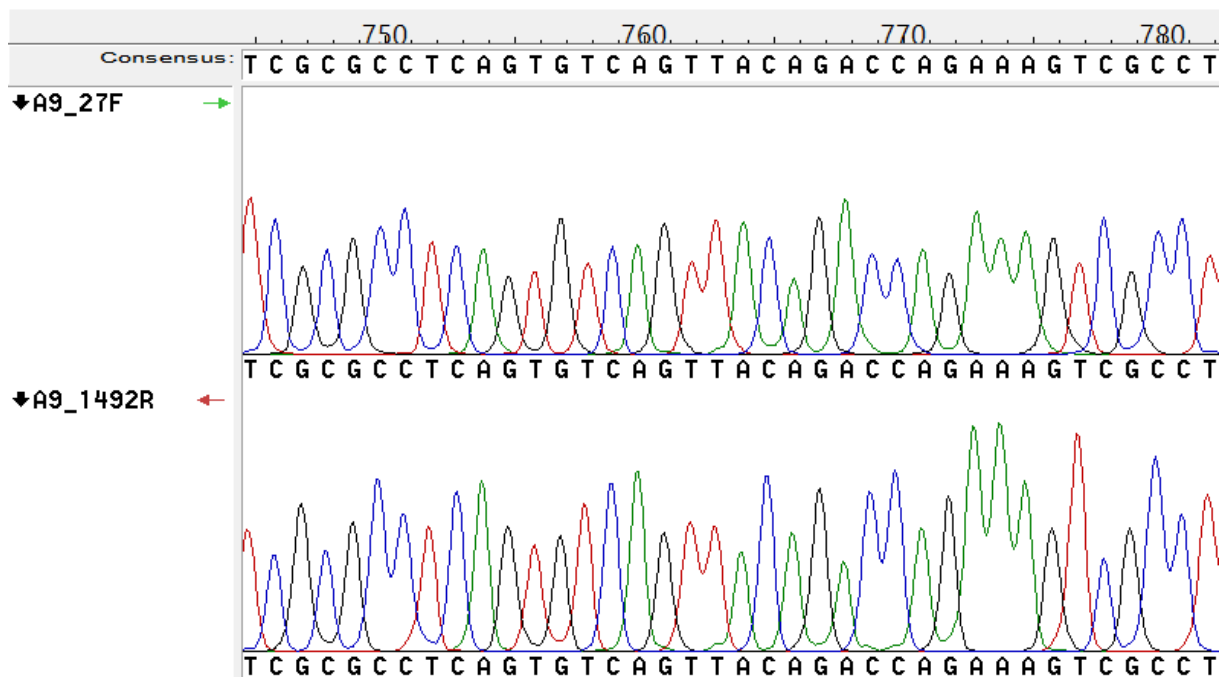
fragmenta korišten je molekularni biljeg DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder (Sigma-Aldrich). Vizualizirani PCR fragmenti s molekularnim biljegom nakon elektroforeze prikazani su na **Slici 9**.



Slika 9. Primjer agarozne gel elektroforeze nakon uspješne amplifikacije fragmenta 16S rRNA gena (1465 pb). Molekularni biljeg je DirectLoad™ 50 bp DNA Step Ladder. Posljednja jažica predstavlja negativnu kontrolu.

3.5.4. Sekvenciranje i obrada 16S nukleotidnih sekvenci

Pročišćavanje PCR produkata i određivanje njihove primarne strukture sekvenciranjem Sangerovom dideoksi metodom provedeno je u komercijalnom servisu (Macrogen, Inc.). Svaki PCR produkt je sekvenciran s dvije strane, oligonukleotidnim početnicama 27F i 1492R. Pregledavanje i obrada sekvenci uz pomoć programa GeneStudio (GeneStudio, Inc.) uključivala je preklapanje uzvodnog i nizvodnog nukleotidnog slijeda te izrezivanje manje kvalitetnih dijelova kromatograma (**Slika 10.**). Nakon toga, pomoću programa BLAST (engl. *Basic Local Alignment Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) eksperimentalno dobivene 16S rRNA sekvence uspoređene su s 16S rRNA sekvencama koje su dostupne u bazi NCBI (*16S ribosomal RNA sequences, Bacteria and Archaea, National Center for Biotechnology Information – NCBI*), uz korištenje zadanih postavki programa. Na taj je način za svaki bakterijski izolat utvrđena najsirodnija bakterijska vrsta prisutna u bazama podataka te se u rezultatima kao rezultat identifikacije izolata koristi bakterijska vrsta iz NCBI baze čija 16S sekvenca ima najveći postotak sličnosti sa 16S sekvencom izolata. Ukoliko ima više od jedne sekvence u NCBI bazi s jednako visokim postotkom sličnosti, navodi se više jednakovrijednih rezultata identifikacije.



Slika 10. Primjer preklapanja dva kromatograma izolata 3.2 u programu GeneStudio.

3.5.5. Filogenetska analiza

Višestruko sravnjenje dobivenih nukleotidnih sljedova izvršeno je uz pomoć programa MAFFT, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/> (Kato i Standley, 2013). Nakon toga, višestruko sravnjeni nukleotidni sljedovi uređeni su u programima SeaView (Gouy, Guindon i Gascuel, 2010) i BioEdit (Hall, Biosciences i Carlsbad, 2011). Konačno sravnjenje sadržavalo je 90 nukleotidnih slijedova bakterijskih gena za 16S rRNA i bilo je dugačko 1020 nukleotida. Devet nukleotidnih slijedova (izolati 1.2, 1.19, 1.22, 1.26, 1.36, 2.4, 2.29, 3.16 i 3.27) nisu uključeni u sravnjenje zbog nedovoljne dužine kvalitetnog kromatograma nakon sekvenciranja. Koristeći višestruko sravnjenje nukleotidnih slijedova kao ulazne podatke, provedena je filogenetska analiza metodom Bayesian-ovog zaključivanja, upotrebom programa Mr. Bayes (Ronquist i Huelsenbeck, 2003) s 1 000 000 iteracija. Podrška grananjima u BA analizi izražena je putem vrijednosti posteriornih vjerojatnosti (engl. *Bayesian posterior probabilities*). Dobiveno filogenetsko stablo grafički je uređeno uz pomoć programa iTOL (Letunic i Bork, 2016).

3.6. Određivanje rezistencije izolata na različite klase antibiotika

Svi prikupljeni okolišni izolati su sterilnom mikrobiološkom ušicom precijepljeni na TSA krute hranjive podloge koje su sadržavale različite antibiotike (Sigma-Aldrich) kako bi se ispitala njihova sposobnost rasta u prisutnosti antibiotika koji pripadaju različitim skupinama antimikrobnih spojeva i imaju različite mehanizme djelovanja (**Tablica 6.**). Za ampicilin, tetraciklin, kanamicin i kloramfenikol odabrane su konačne koncentracije koje su u skladu s koncentracijama najčešće korištenim u laboratorijske svrhe kod selekcije plazmidne DNA (<https://www.addgene.org/mol-bio-reference/antibiotics/>) (EUCAST, 2003). U odnosu na utvrđene inhibitorne koncentracije (EUCAST, 2003), za preostala četiri antibiotika uzete su nekoliko puta veće konačne koncentracije: cefotaksim (8x), eritromicin (2x), ciprofloksacin (10x) i trimetoprim (2x). Izolati su u prisutnosti antibiotika uzgojeni 3 dana pri sobnoj temperaturi te je zabilježeno da li je došlo do porasta bakterijskih kolonija.

Tablica 6. Korišteni antibiotici.

Skupina antibiotika	Antibiotik	Kratika u radu	Otapalo	Koncentracija matične otopine (mg/mL)	Konačna koncentracija (µg/mL)
Penicilini	Ampicilin	AMP	dH ₂ O	50	100
β-laktami	Cefotaksim	CEF	dH ₂ O	100	32
Fluorokvinoloni	Ciprofloksacin	CIP	CH ₃ OH:dH ₂ O= =1:1+HCl (0,2%)	10	5
Makrolidi	Eritromicin	ERI	CH ₃ OH	30	50
Aminoglikozidi	Kanamicin	KAN	dH ₂ O	50	64
Kloramfenikoli	Kloramfenikol	KLF	C ₂ H ₆ O (70%)	30	32
Tetraciklini	Tetraciklin	TET	dH ₂ O	10	16
Diaminopiridini	Trimetoprim	TMP	DMSO	50	20

4. REZULTATI

4.1. Usporedba molekularnih metoda za taksonomsku determinaciju izolata

Za determinaciju taksonomske pripadnosti izolata korištene su dvije molekularne metode: MALDI-TOF MS i sekvenciranje 16S rRNA gena (**Tablici 7**). MALDI-TOF MS se najčešće koristi u determinaciji kliničkih izolata, a sekvenciranje 16S rRNA gena je univerzalna metoda za pouzdanu determinaciju mikrobnih izolata do razine roda/vrste (Topić Popović i sur., 2016). Rezultati prikupljeni tijekom ovog istraživanja su pokazali vrlo dobro podudaranje rezultata dvaju metoda. Za čak 85,9% izolata zabilježeno je podudaranje rezultata: za 32,3% izolata determinacija se podudarala na razini vrste, a za 53,5% na razini roda. Samo za 14,1% izolata nije bilo podudaranja. Čak su i rezultati kategorije C, iako se smatraju nepouzdanima prema MALDI-TOF MS klasifikaciji, u velikom broju slučajeva bili točni na razini roda (12 od ukupno 35 rezultata kategorije C – 34,3%) ili vrste (9 od ukupno 35 rezultata kategorije C – 25,7%).

Tablica 7. Usporedba rezultata MALDI-TOF MS-a i sekvenciranja 16S rRNA gena.

	MALDI-TOF MS	Sekvenciranje 16S rRNA gena	
1.1	<i>Bacillus altitudinis</i> (+) (B)	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	✓
1.2	<i>Bacillus simplex</i> (+) (B)	<i>[Brevibacterium] frigiditolerans</i> (99%)	✓
1.3	<i>Bacillus cereus</i> (+) (B)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	✓
1.4	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (-) (C)	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> (99%)	✓
1.5	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> (-) (C)	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> (99%)	✓
1.6	<i>Bacillus megaterium</i> (++) (A)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	✓
1.7	<i>Pseudomonas proteolytica</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	✓
1.8	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	✓
1.9	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Sporosarcina ureae</i> (100%)	-
1.10	<i>Exiguobacterium</i> sp. (+) (B)	<i>Exiguobacterium undae</i> (100%)	✓
1.11	<i>Bacillus mycoides</i> (+) (B)	<i>Bacillus toyonensis</i> (99%)	✓
1.12	<i>Bacillus thuringiensis</i> (+) (B)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	✓
1.13	<i>Bacillus subtilis</i> (-) (C)	<i>Bacillus mojaviensis</i> (100%)	✓
1.14	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (-) (C)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	✓
1.15	<i>Bacillus megaterium</i> (++) (A)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	✓
1.16	<i>Bacillus cereus</i> (+) (B)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	✓
1.17	<i>Bacillus marisflavi</i> (+) (B)	<i>Bacillus marisflavi</i> (100%)	✓
1.18	<i>Bacillus altitudinis</i> (+) (B)	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	✓
1.19	<i>Bacillus thuringiensis</i> (++) (A)	<i>B. toyonensis/cereus/thuringiensis</i> (100%)	✓
1.20	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (99%)	-
1.21	<i>Bacillus altitudinis</i> (+) (B)	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	✓

	MALDI-TOF MS	Sekvenciranje 16S rRNA gena	
1.22	<i>Bacillus mycooides</i> (+) (B)	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	✓
1.23	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (++) (B)	<i>Lysinibacillus sphaericus/fusiformis</i> (100%)	✓
1.24	<i>Bacillus altitudinis</i> (+) (B)	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	✓
1.25	<i>Bacillus simplex</i> (+) (B)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	-
1.26	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (++) (A)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (99%)	✓
1.27	<i>Bacillus mycooides</i> (+) (B)	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	✓
1.28	<i>Exiguobacterium</i> sp. (-) (C)	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> (99%)	✓
1.29	<i>Sporosarcina psychrophila</i> (-) (C)	<i>Sporosarcina psychrophila</i> (99%)	✓
1.30	<i>Bacillus mycooides</i> (+) (B)	<i>B. mycooides/weihenstephanensis</i> (100%)	✓
1.31	<i>Bacillus megaterium</i> (++) (A)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (99%)	✓
1.32	<i>Bacillus simplex</i> (-) (C)	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	✓
1.33	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (++) (A)	<i>R. jialingiae/qingshengii/degradans</i> (100%)	✓
1.34	<i>Bacillus thuringiensis</i> (+) (B)	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	✓
1.35	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (-) (C)	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> (99%)	✓
1.36	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> (99%)	-
1.37	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (-) (C)	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> (100%)	✓
1.38	<i>Sporosarcina globispora</i> (-) (C)	<i>Sporosarcina globispora</i> (99%)	✓
1.39	<i>Bacillus thuringiensis</i> (+) (B)	<i>B. toyonensis/cereus/thuringiensis</i> (100%)	✓
2.1	<i>Pseudomonas brenneri</i> (++) (A)	<i>Pseudomonas gessardii</i> (99%)	✓
2.2	<i>Pseudomonas gessardii</i> (++) (A)	<i>Pseudomonas gessardii</i> (99%)	✓
2.3	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (++) (A)	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (99%)	✓
2.4	<i>Pseudomonas mandelii</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas baetica</i> (99%)	✓
2.5	<i>Pseudomonas mandelii</i> (++) (A)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	✓
2.6	<i>Pseudomonas putida</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (99%)	✓
2.7	<i>Pseudomonas koreensis</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	✓
2.8	<i>Bacillus thuringiensis</i> (+) (B)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99%)	✓
2.9	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Bacillus marisflavi</i> (99%)	-
2.10	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas baetica</i> (99%)	✓
2.11	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (+) (B)	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99%)	-
2.12	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> (+) (B)	<i>B. mycooides/weihenstephanensis</i> (100%)	✓
2.13	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	✓
2.14	<i>Bacillus megaterium</i> (+) (B)	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	✓
2.15	<i>Bacillus simplex</i> (-) (C)	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	✓
2.16	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas jessenii</i> (99%)	✓
2.17	<i>Pseudomonas jessenii</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas baetica</i> (99%)	✓
2.18	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas jessenii</i> (99%)	✓
2.19	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (-) (C)	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	✓
2.20	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (+) (B)	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	✓
2.21	<i>Chryseobacterium indologenes</i> (-) (C)	<i>Chryseobacterium oleae</i> (99%)	✓
2.22	<i>Bacillus simplex</i> (+) (B)	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	✓
2.23	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Arthrobacter agilis</i> (99%)	-
2.24	<i>Bacillus thuringiensis</i> (+) (B)	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	✓
2.25	<i>Bacillus mycooides</i> (++) (A)	<i>B. mycooides/weihenstephanensis</i> (99%)	✓
2.26	<i>Bacillus cereus</i> (+) (B)	<i>Bacillus toyonensis</i> (99%)	✓
2.27	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Sporosarcina luteola</i> (99%)	-
2.28	<i>Bacillus cereus</i> (+) (B)	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (99%)	✓
2.29	<i>Bacillus simplex</i> (++) (A)	<i>Bacillus simplex</i> (100%)	✓

	MALDI-TOF MS	Sekvenciranje 16S rRNA gena	
2.30	<i>Agromyces cerinus</i> (-) (C)	<i>Agromyces terreus</i> (99%)	✓
2.31	<i>Bacillus pumilus</i> (+) (B)	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	✓
2.32	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (+) (B)	<i>Rhodococcus agglutinans</i> (99%)	✓
2.33	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (+) (B)	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> (99%)	✓
3.1	<i>Bacillus cereus</i> (+) (B)	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	✓
3.2	<i>Bacillus mycoides</i> (+) (B)	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	✓
3.3	<i>Bacillus mycoides</i> (+) (B)	<i>Bacillus toyonensis</i> (100%)	✓
3.4	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (+) (B)	<i>Paenibacillus peoriae</i> (99%)	✓
3.5	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (+) (B)	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)	✓
3.6	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	-
3.7	<i>Bacillus thuringiensis</i> (-) (C)	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	✓
3.8	<i>Streptomyces griseus</i> (-) (C)	<i>Streptomyces sanglieri</i> (100%)	✓
3.9	<i>Bacillus cereus</i> (-) (C)	<i>B. toyonensis/cereus/thuringiensis</i> (100%)	✓
3.10	<i>Curtobacterium luteum</i> (-) (C)	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> (99%)	✓
3.11	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+) (B)	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	-
3.12	<i>Curtobacterium albidum</i> (-) (C)	<i>Curtobacterium herbarum</i> (99%)	✓
3.13	<i>Bacillus muralis</i> (-) (C)	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	✓
3.14	<i>Bacillus simplex</i> (+) (B)	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	✓
3.15	<i>Bacillus simplex</i> (-) (C)	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	✓
3.16	<i>Micrococcus terreus</i> (++) (A)	<i>Micrococcus terreus</i> (99%)	✓
3.17	<i>Staphylococcus warneri</i> (++) (A)	<i>Staphylococcus warneri</i> (100%)	✓
3.18	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	-
3.19	<i>Micrococcus luteus</i> (++) (A)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (99%)	✓
3.20	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (++) (A)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (100%)	✓
3.21	<i>Bacillus simplex</i> (-) (C)	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	✓
3.22	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Phycicola gilvus</i> (99%)	-
3.23	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Bacillus subterraneus</i> (99%)	-
3.24	nepouzdana determinacija (-) (C)	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	-
3.25	<i>Bacillus simplex</i> (-) (C)	<i>Bacillus simplex</i> (100%)	✓
3.26	<i>Acinetobacter schindleri</i> (+) (B)	<i>Acinetobacter schindleri</i> (100%)	✓
3.27	<i>Micrococcus luteus</i> (++) (A)	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (98%)	✓

Pouzdanost determinacije MALDI-TOF MS-om: (++) (A) pouzdana do vrste, (++) (B) i (+) (B) pouzdana do roda te (-) (C) nepouzdana determinacija. U slučajevima kada je MALDI-TOF MS determinacija bila nepouzdana, ipak su navedeni rezultati determinacije ako su se podudarali sa determinacijom sekvenciranjem prema rodu ili vrsti.

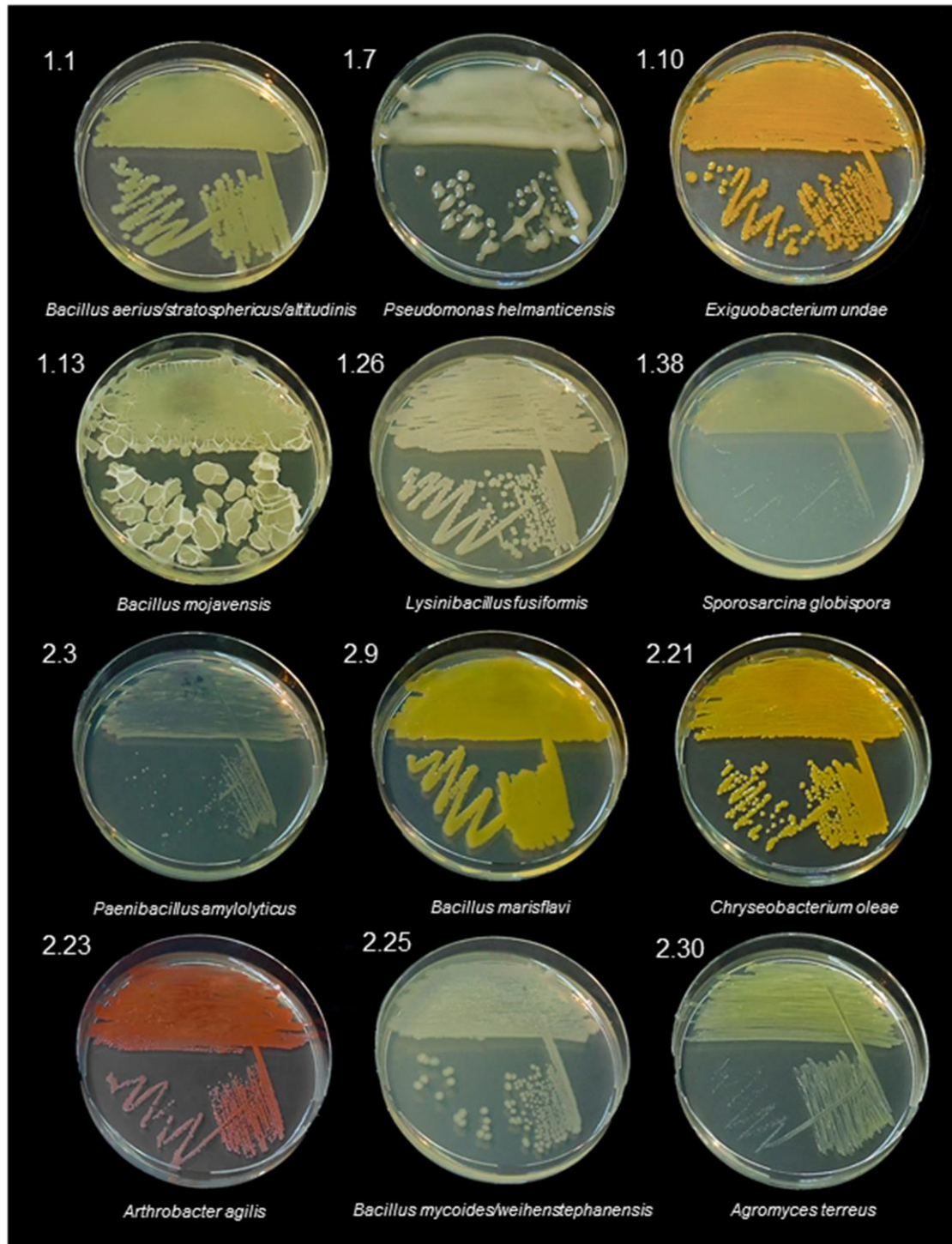
Pouzdanost determinacije sekvenciranjem 16S rRNA gena: u zagradi se nalazi postotak sličnosti s najbližom sekvencijom iz NCBI baze.

Podudaranje rezultata dvaju metoda: ✓ podudaranje na razini vrste, ✓ podudaranje razini roda, - bez podudaranja.

4.2. Banka bakterijskih izolata Markovog ponora

Ukupno je izolirano i determinirano 99 izolata koji su u najvećem broju pripadali koljenima Firmicutes (71,1%), zatim Proteobacteria (razred Gammaproteobacteria) (15,1%), Actinobacteria (12,1%) i Bacteroidetes (1,01%). Banka izolata osim što se odlikuje taksonomskom raznolikošću, također pokazuje



































































zaista značajnu i interesantnu morfološku raznolikost koja je prikazana na **Slici 11**. Ukupno, banka sadrži 45 različitih vrsta iz 17 rodova. U **Tablici 8**. su navedene i morfološki opisane sve pronađene vrste, kao i njihova brzina rasta i podatak o mikrostaništu s kojeg potječu.



Slika 11. Prikaz izrazite morfološke raznolikosti izabranih izolata. (Foto: Vuk M.)

Tablica 8. Popis izoliranih vrsta prema mjestu uzorkovanja uz navedeni morfološki opis i procijenjenu brzinu rasta.

	Vrsta	Broj izolata prema mikrostanistu			Boja i brzina rasta	Oblik	Profil	Tlocrt	Površina	Konzistencija
		1.	2.	3.						
Actinobacteria	<i>Agromyces terreus</i>	0	1	0	+				svjetlucava	konzistencija maslaca
	<i>Arthrobacter agilis</i>	0	1	0	+				svjetlucava	konzistencija maslaca
	<i>Curtobacterium herbarum</i>	0	0	1	+				glatka	ljepljiva
	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	0	0	1	+				mat	konzistencija maslaca
	<i>Micrococcus terreus</i>	0	0	1	+				naborana	krta
	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0	0	2	+				mat	ljepljiva
	<i>Phycicola gilvus</i>	0	0	1	+				svjetlucava	ljepljiva
	<i>Rhodococcus jialingiae/qingshengii/degradans</i>	1	0	0	+				glatka	mukozna
	<i>Rhodococcus agglutinans</i>	0	1	0	+++				svjetlucava	mukozna
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0	0	1	+				svjetlucava	konzistencija maslaca
<i>Streptomyces sanglieri</i>	0	0	1	+				mat	krta	
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium oleae</i>	0	1	0	+				mat	konzistencija maslaca
Firmicutes	<i>Bacillus aerius/stratosphericus/altitudinis</i>	5	0	0	+++				mat	konzistencija maslaca
	<i>Bacillus mycoides/weihenstephanensis</i>	1	2	0	+++				mat	ljepljiva
	<i>Bacillus toyonensis/cereus/thuringiensis</i>	2	0	1	+++				mat	krta
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	4	1	0	+++				mat	konzistencija maslaca
	<i>Bacillus cereus</i>	2	1	1	+++				mat	krta
	<i>Bacillus marisflavi</i>	1	1	0	+++				svjetlucava	ljepljiva
	<i>Bacillus mojavensis</i>	1	0	0	+++				naborana	mukozna

	Vrsta	Broj izolata prema mikrostanjstvu			Boja i brzina rasta	Oblik	Profil	Tlocrt	Površina	Konzistencija
		1.	2.	3.						
Firmicutes	<i>Bacillus nealsonii</i>	0	0	4	++				svjetlucava	ljepljiva
	<i>Bacillus pumilus</i>	0	1	0	+				svjetlucava	ljepljiva
	<i>Bacillus simplex</i>	0	1	2	++				svjetlucava	mukozna
	<i>Bacillus subterraneus</i>	0	0	1	++				svjetlucava	krta
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2	2	0	+++				mat	krta
	<i>Bacillus toyonensis</i>	1	1	1	+++				mat	krta
	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i>	2	1	2	+++				mat	krta
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i>	1	2	3	+++				svjetlucava	mukozna
	<i>Exiguobacterium sibiricum</i>	1	0	0	+++				svjetlucava	krta
	<i>Exiguobacterium undae</i>	1	0	0	++				svjetlucava	konzistencija maslaca
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	3	1	0	+++				glatka	ljepljiva
	<i>Lysinibacillus parvivoronicapiens</i>	4	0	0	+++				glatka	konzistencija maslaca
	<i>Lysinibacillus sphaericus/fusiformis</i>	1	0	0	+++				glatka	konzistencija maslaca
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	0	1	0	+				svjetlucava	mukozna
	<i>Paenibacillus peoriae</i>	0	0	1	++				glatka	krta
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	0	0	1	++				glatka	krta
	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	1	1	0	+				mat	ljepljiva
	<i>Sporosarcina globispora</i>	1	0	0	++				svjetlucava	krta
	<i>Sporosarcina luteola</i>	0	1	0	++				svjetlucava	konzistencija maslaca
	<i>Sporosarcina psychrophila</i>	1	0	0	+				svjetlucava	konzistencija maslaca
<i>Sporosarcina ureae</i>	1	0	0	++				svjetlucava	ljepljiva	
<i>Staphylococcus warneri</i>	0	0	1	+				svjetlucava	ljepljiva	

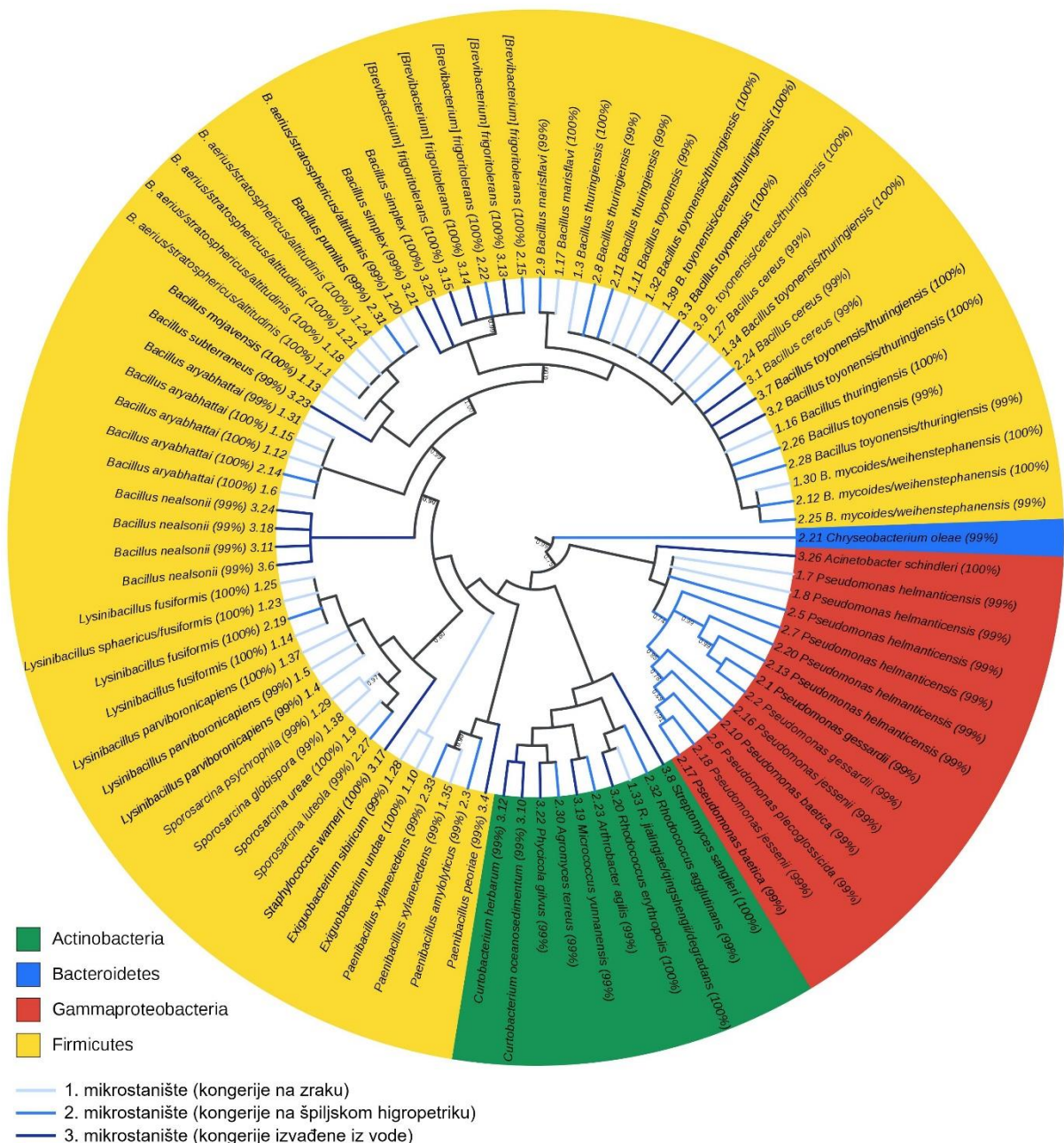
	Vrsta	Broj izolata prema mikrostaništu			Boja i brzina rasta	Oblik	Profil	Tlocrt	Površina	Konzistencija
		1.	2.	3.						
Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter schindleri</i>	0	0	1	++				mat	ljepljiva
	<i>Pseudomonas baetica</i>	0	3	0	+				svjetlucava	mukozna
	<i>Pseudomonas gessardii</i>	0	2	0	++				mat	ljepljiva
	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	2	4	0	+++				svjetlucava	mukozna
	<i>Pseudomonas jessenii</i>	0	2	0	+				svjetlucava	mukozna
	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0	1	0	++				hrapava	mukozna

Brzina rasta je procijenjena dvjema varijablama, broj potrebnih dana za uzgoj i promjer pojedinačne kolonije u mm. Oznaka „+++“ je dodijeljena izolatima kojima je jedan dan bio dovoljan da postignu promjer veći ili jednak 1 mm, zatim „++“ onima koji su za jedan ili dva dana bili veći od 0,5 mm. Preostala kategorija „+“ je dodijeljena najsporijima kojima je trebalo do 3 dana da narastu do značajnije biomase.

Oznake mikrostabišta „1.“, „2.“ i „3.“ predstavljaju količinu vode koja je u dodiru s obraštajnim mikrobnim zajednicama. „1.“ – kongerija koje su na zraku te jedini izvor vode predstavlja vlaga u zraku. „2.“ – kongerija na špiljskom higropetrikumu. „3.“ kongerija u vodi, odnosno izvađena iz vode radi uzorkovanja.

Među izoliranim vrstama (45 vrsta) prevladavaju brzorastuće bakterije (17 vrsta odnosno 37.8% ukupnog broja vrsta), označene oznakom +++ u **Tablici 8.** Većina brzorastućih vrsta pripada koljenu Firmicutes (15/17 +++ vrsta). Izolati brzorastućih vrsta najčešće su izolirani s kongerijama na zraku (1. mikrostanište). Koljeno Firmicutes također prevladava i među vrstama srednje brzine rasta (oznaka ++; 9/12 ++ vrsta). Izolati ovih vrsta su najčešće pronađeni na kongerijama iz vode (3. mikrostanište). Kategorija spororastućih vrsta (oznaka +) jedina obuhvaća sva četiri pronađena koljena, među kojima prevladava koljeno Actinobacteria (10/18 + vrsta). Među njima su bili podjednako zastupljeni izolati s 2. i 3. mikrostaništa, odnosno izolati s kongerijama na špiljskom higropetrikumu i izolati s kongerijama u vodi.

Filogenetsko stablo (**Slika 12.**) sažima rezultate sekvenciranja 16S rRNA gena te pokazuje filogenetske odnose izolata.

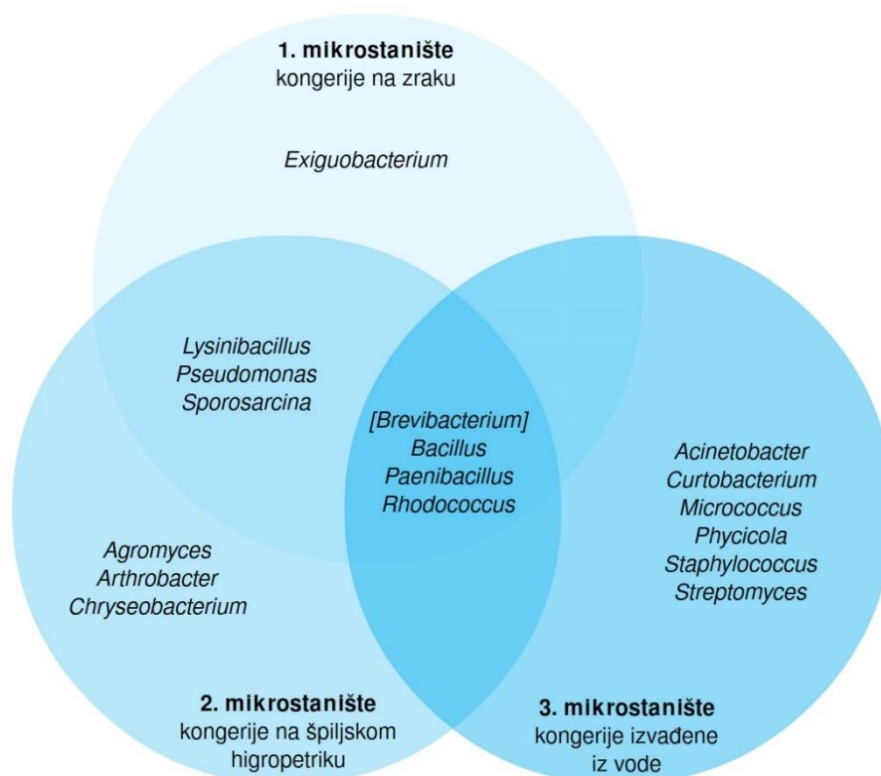


Slika 12. Filogenetsko stablo bakterijskih izolata iz Markovog ponora. Podrška grananjima prikazana je kao posteriorne vjerojatnosti, a na ograncima bez prikazane vrijednosti posteriorne vjerojatnost iznosila je 1,00.

4.3. Ovisnost sastava bakterijskih zajednica o količini vode

Količina vode, kao jedini varijabilni ekološki čimbenik krškog podzemlja, utječe na bioraznolikost i rasprostranjenost rodova obraštajnih mikrobnih zajednica. Iz **Slike 13.** vidljivo je kako su neki rodovi prisutni u banci izolata ubikvitarni, odnosno

pronađeni su na svim staništima bez obzira na količinu vode: *Bacillus*, *Paenibacillus* i *Rhodococcus*. Nasuprot tome, neki rodovi su pronađeni samo na kongerijama na zraku (*Exiguobacterium*), na higropetniku (*Agromyces*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*) ili u vodi (*Acinetobacter*, *Curtobacterium*, *Micrococcus*, *Phycicola*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*).



Slika 13. Raspodjela izoliranih rodova prema mikrostaništu.

4.4. Rezistencija na antibiotike u krškom podzemlju

U **Tablici 9.** prikazani su rezultati testiranja banke izolata iz Markovog ponora na rezistenciju prema osam antibiotika iz različitih kemijskih skupina. Općenito, među izolatima je bio najveći udio rezistentnih na CEF (51%), zatim AMP i TMP (49%) te CIP (37%), dok je na ostale antibiotike bio rezistentan manji udio izolata. Najmanje izolata bilo je rezistentno na KAN – 5%. Kada se izolati podijele na podskupine prema tome kako se boje po Gramu, Gram negativni izolati pokazuju znatno veći udio antibiotičke rezistencije na AMP, CEF, ERI, KLF, TET i TMP od Gram pozitivnih. Nasuprot tome, kod Gram pozitivnih bakterija je pokazan veći udio rezistencije na

CIP. Međutim, ovdje valja naglasiti da Gram negativnih izolata u banci ima znatno manje u odnosu na Gram pozitivne (samo 16,1%) i to uglavnom iz roda *Pseudomonas*.

Čak 80,9% izolata pokazalo je rezistenciju barem na jedan antibiotik, a dva izolata su bila rezistentna na svih 8 testiranih antibiotika: 2.11 (*Bacillus thuringiensis* 99%) i 2.13 (*Pseudomonas helmanticensis* 99%). Od svih izolata, 19,1% nije bilo rezistentno niti na jedan antibiotik (**Tablica 10.**).

Tablica 9. Rezistencija istraženih izolata iz Markovog ponora prema različitim klasama antibiotika.

		Gram	Izolat	AMP	CEF	CIP	ERI	KAN	KLF	TET	TMP
Actinobacteria	<i>Agromyces terreus</i> (99%)	poz.	2.30	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Arthrobacter agilis</i> (99%)	poz.	2.23	-	-	+	-	-	-	-	+
	<i>Curtobacterium herbarum</i> (99%)	poz.	3.12	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> (99%)	poz.	3.10	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Micrococcus terreus</i> (99%)	poz.	3.16	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (98%)	poz.	3.27	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (99%)	poz.	3.19	-	+	+	-	-	-	+	+
	<i>Phycicola gilvus</i> (99%)	poz.	3.22	+	-	+	-	+	-	-	-
	<i>Rhodococcus agglutinans</i> (99%)	poz.	2.32	+	+	+	-	-	-	+	+
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (100%)	poz.	3.20	-	-	+	-	-	-	+	+
	<i>R. jialingiae/qingshengii/degradans</i> (100%)	poz.	1.33	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces sanglieri</i> (100%)	poz.	3.8	-	-	+	-	-	-	-	-	
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium oleae</i> (99%)	neg.	2.21	+	+	+	-	+	+	+	-
Firmicutes	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	poz.	1.1	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	poz.	1.18	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	poz.	1.21	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (100%)	poz.	1.24	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (99%)	poz.	1.20	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	poz.	1.12	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	poz.	1.15	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	poz.	1.6	+	+	+	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	poz.	2.14	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus aryabhatai</i> (99%)	poz.	1.31	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	poz.	1.22	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	poz.	1.27	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	poz.	2.24	+	+	+	-	-	-	+	+
	<i>Bacillus cereus</i> (99%)	poz.	3.1	+	+	-	-	-	-	+	+
	<i>Bacillus marisflavi</i> (100%)	poz.	1.17	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus marisflavi</i> (99%)	poz.	2.9	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Bacillus mojavensis</i> (100%)	poz.	1.13	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>B. mycoides/weihenstephanensis</i> (100%)	poz.	1.30	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>B. mycoides/weihenstephanensis</i> (100%)	poz.	2.12	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>B. mycoides/weihenstephanensis</i> (99%)	poz.	2.25	+	+	-	-	-	-	-	+	
<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	poz.	3.11	-	-	+	-	-	-	-	-	

	Gram	Izolot	AMP	CEF	CIP	ERI	KAN	KLF	TET	TMP	
Firmicutes	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	poz.	3.18	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	poz.	3.24	-	+	+	-	-	+	+	
	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	poz.	3.6	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Bacillus pumilus</i> (99%)	poz.	2.31	-	-	+	-	-	-	-	
	<i>Bacillus simplex</i> (100%)	poz.	2.29	+	-	+	-	-	-	-	
	<i>Bacillus simplex</i> (100%)	poz.	3.25	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Bacillus simplex</i> (99%)	poz.	3.21	-	+	+	-	-	-	-	
	<i>Bacillus subterraneus</i> (99%)	poz.	3.23	-	-	-	-	-	-	-	
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	poz.	1.16	+	+	+	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (100%)	poz.	1.3	-	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99%)	poz.	2.11	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Bacillus thuringiensis</i> (99%)	poz.	2.8	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus toyonensis</i> (100%)	poz.	3.3	+	+	-	-	-	-	+	+
	<i>Bacillus toyonensis</i> (99%)	poz.	1.11	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus toyonensis</i> (99%)	poz.	2.26	+	+	-	-	-	-	+	+
	<i>B. toyonensis/cereus/thuringiensis</i> (100%)	poz.	1.19	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>B. toyonensis/cereus/thuringiensis</i> (100%)	poz.	1.39	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>B. toyonensis/cereus/thuringiensis</i> (100%)	poz.	3.9	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	poz.	1.32	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	poz.	1.34	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	poz.	3.2	+	+	-	-	-	-	+	+
	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (100%)	poz.	3.7	+	+	-	-	-	-	+	+
	<i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (99%)	poz.	2.28	+	+	+	-	-	-	+	+
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	poz.	2.15	+	-	-	-	-	-	-	+
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	poz.	2.22	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	poz.	3.13	+	+	+	-	-	-	-	+
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	poz.	3.14	+	-	+	-	-	-	-	+
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (100%)	poz.	3.15	-	-	+	-	-	-	-	+
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (99%)	poz.	1.2	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> (99%)	poz.	1.28	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Exiguobacterium undae</i> (100%)	poz.	1.10	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	poz.	1.14	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	poz.	1.25	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	poz.	2.19	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (99%)	poz.	1.26	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus parvivoronicapiens</i> (100%)	poz.	1.37	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus parvivoronicapiens</i> (99%)	poz.	1.36	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus parvivoronicapiens</i> (99%)	poz.	1.4	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Lysinibacillus parvivoronicapiens</i> (99%)	poz.	1.5	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>L. sphaericus/fusiformis</i> (100%)	poz.	1.23	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Paenibacillus amyolyticus</i> (99%)	poz.	2.3	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Paenibacillus peoriae</i> (99%)	poz.	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Paenibacillus polymyxa</i> (99%)	poz.	3.5	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> (99%)	poz.	1.35	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> (99%)	poz.	2.33	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Sporosarcina globispora</i> (99%)	poz.	1.38	+	+	-	-	-	-	-	+	
<i>Sporosarcina luteola</i> (99%)	poz.	2.27	-	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Sporosarcina psychrophila</i> (99%)	poz.	1.29	+	-	+	-	-	-	-	-	
<i>Sporosarcina ureae</i> (100%)	poz.	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Staphylococcus warneri</i> (100%)	poz.	3.17	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter schindleri</i> (100%)	neg.	3.26	+	+	-	-	-	-	+	
	<i>Pseudomonas baetica</i> (99%)	neg.	2.10	+	+	-	+	-	+	+	
	<i>Pseudomonas baetica</i> (99%)	neg.	2.17	+	+	-	+	-	+	+	
	<i>Pseudomonas baetica</i> (99%)	neg.	2.4	+	+	-	+	-	+	+	
	<i>Pseudomonas gessardii</i> (99%)	neg.	2.1	+	+	-	+	-	+	-	
	<i>Pseudomonas gessardii</i> (99%)	neg.	2.2	+	+	-	+	-	+	-	
	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	neg.	1.7	+	+	-	+	-	+	+	
	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	neg.	1.8	+	+	-	+	-	+	-	
	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	neg.	2.13	+	+	+	+	+	+	+	
	<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	neg.	2.20	+	+	-	+	+	+	+	
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	neg.	2.5	+	+	-	+	-	+	-		

	Gram	Izolat	AMP	CEF	CIP	ERI	KAN	KLF	TET	TMP
<i>Pseudomonas helmanticensis</i> (99%)	neg.	2.7	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>Pseudomonas jessenii</i> (99%)	neg.	2.16	+	+	-	+	-	+	+	+
<i>Pseudomonas jessenii</i> (99%)	neg.	2.18	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (99%)	neg.	2.6	+	-	-	+	-	+	+	+
Postotak izolata rezistentnih na određeni antibiotik:			49%	51%	37%	15%	5%	16%	24%	49%

AMP (ampicilin iz skupine penicilina), CEF (cefotaksim iz skupine β -laktama), CIP (ciprofloksacin iz skupine fluorokvinalona), ERI (eritromicin iz skupine makrolida), KAN (kanamicin iz skupine aminoglikozida), KLF (kloramfenikol iz skupine kloramfenikola), TET (tetraciklin iz skupine tetraciklina) i TMP (trimetoprim iz skupine diaminopiridina).

Tablica 10. Izolati koji nisu rezistentni niti na jedan od ispitanih antibiotika.

	Vrsta	Izolat
Actinobacteria	<i>Curtobacterium herbarum</i> (99%)	3.12
	<i>Micrococcus yunnanensis</i> (98%)	3.27
Firmicutes	<i>B. aerius/stratosphericus/altitudinis</i> (99%)	1.20
	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	1.15
	<i>Bacillus mojavensis</i> (100%)	1.13
	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	3.18
	<i>Bacillus nealsonii</i> (99%)	3.6
	<i>Bacillus simplex</i> (100%)	3.25
	<i>Bacillus subterraneus</i> (99%)	3.23
	<i>[Brevibacterium] frigoritolerans</i> (99%)	1.2
	<i>Exiguobacterium sibiricum</i> (99%)	1.28
	<i>Exiguobacterium undae</i> (100%)	1.10
	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> (100%)	1.14
	<i>Lysinibacillus parviboronicapiens</i> (99%)	1.4
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> (99%)	2.3
	<i>Paenibacillus peoriae</i> (99%)	3.4
	<i>Paenibacillus xylanexedens</i> (99%)	1.35
<i>Sporosarcina ureae</i> (100%)	1.9	
<i>Staphylococcus warneri</i> (100%)	3.17	

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi raznolikost obraštajnih mikrobnih zajednica i odrediti prisutnu antibiotsku rezistenciju u Markovom ponoru kao primjeru očuvanog i nezagađenog podzemnog staništa Dinarskog krša. Općenito, mikrobne zajednice čine osnovu hranidbenih mreža u podzemlju i stoga su od neizmjerne važnosti za podzemne ekosustave (Simon, 2008).

5.1. Primjena MALDI-TOF MS u okolišnoj mikrobiologiji

MALDI-TOF MS je metoda determinacije mikroorganizama prvenstveno razvijena radi brze determinacije klinički važnih izolata. Međutim, u posljednje se vrijeme zbog brzine i prihvatljive cijene sve više primjenjuje u okolišnoj mikrobiologiji. Ukoliko ispitani izolat postoji u MALDI-TOF MS bazi spektara, moguće je točno odrediti njegovu vrstu, pa čak i soj (Angelakis i sur., 2014; Lee i sur., 2014; Topić Popović i sur., 2016; Santos, Hildenbrand i Schug, 2016). Glavna mana ove metode je činjenica da MALDI-TOF MS baza još uvijek nije dovoljno velika i ne uključuje dovoljno velik broj okolišnih izolata što rezultira nepouzdanom determinacijom (Topić Popović i sur., 2016). Osim toga, kako baza nije „teorijska“ već se sastoji od velikog broja unesenih spektara, nije neobično da za određene kliničke vrste postoji velik broj unosa, dok za neke okolišne samo jedan. Zbog toga je determinacija otežana čak i kad se vrsta nalazi u bazi. Nadalje, moguće tehničke poteškoće prilikom taksonomske determinacije MALDI-TOF MS-om uključuju korištenje nedovoljno ili previše biomase, kao i mogućnost kontaminacije.

S druge strane, sekvenciranje gena za 16S rRNA smatra se zlatnim standardom u kontekstu procjene filogenetske raznolikosti u mikrobnim zajednicama (Vos i sur., 2012). Glavni razlozi zbog kojih se slijed nukleotida gena koji kodira za 16S rRNA male podjedinice ribosoma koristi kao marker u istraživanjima bakterijske filogenije i taksonomije su: (i) prisutan je u gotovo svim bakterijama; (ii) sadrži regije koju su visoko očuvane i stoga mogu poslužiti kao ciljne sekvence za vezanje univerzalnih oligonukleotidnih početnica; (iii) sadrži varijabilne regije prema kojima se mikrobnii izolati mogu klasificirati do roda (Janda i Abbott, 2007; Vos i sur., 2012). Međutim, mana ove metode je duže trajanje analiza i veći trošak (Justesen i sur., 2010; Lavigne i sur., 2013) te činjenica da u velikom broju slučajeva ovaj marker gen

ne pruža informaciju o vrsti i soju, već samo o rodu (Vos i sur., 2012). Ponekad se obje metode koriste istovremeno, kako bi rezultati jedne metode potvrdili rezultate druge (Lee i sur., 2014).

Stoga su ovom radu pri taksonomskoj determinaciji izolata uspoređene obje metode te je pokazano vrlo dobro podudaranje rezultata (na razini roda ili vrste) kod čak 85,9% izolata. Čak su i rezultati kategorije C, iako se smatraju nepouzdanima prema MALDI-TOF MS klasifikaciji, u velikom broju slučajeva bili točni. Slični rezultati dobiveni su i u drugim studijama. Primjerice, Böhme i sur. (2013), uzorkovanjem s različitih morskih organizama, su pokazali da je za rodove *Pseudomonas* i *Bacillus* MALDI-TOF MS determinacija bila točnija i od fenotipskog i od genotipskog pristupa: prema 16S rRNA samo je 50% sojeva izolirano do razine vrste, dok je MALDI-TOF MS bio uspješan u 76% slučajeva. Predstavnici spomenutih rodova su u velikom broju obuhvaćeni i u ovom istraživanju, ukupno ih je 64 (rod *Bacillus* s 50 izolata i rod *Pseudomonas* s 14 izolata).

Zaključno, uključivanjem sve većeg broja okolišnih mikroba u MALDI-TOF bazu, ova će metoda postati sve primjenjivija u mikrobiologiji okoliša (Topić Popović i sur., 2016), što je pokazano i u ovom radu.

5.2. Uzgojive bakterije Markovog ponora

Banka izolata Markovog ponora sakupljena u ovom radu predstavlja prvu kolekciju podzemnih krških bakterija za područje Hrvatske. Dosadašnja istraživanja uzgojivih bakterija Dinarskog krškog podzemlja su malobrojna i uglavnom vezana za područje Slovenije. Ovim je istraživanjem, korištenjem neselektivnog hranjivog medija TSA za rast širokog raspona heterotrofnih mikroorganizama, potvrđena prisutnost mnogih izolata zabilježenih za područje Slovenije (Velikonja i sur., 2014; Mulec i sur., 2015) i na području Hrvatske. Primjerice, kao i u ranijim studijama pronađeni su brojni izolati iz rodova *Bacillus* (Firmicutes) i *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) (Megušar i Sket, 1977; Mulec i sur., 2015). Velikonja i sur. (2014) su koristili različite hranjive medije kako bi uzgojili bakterijske izolate iz Pajsarjeve jame te su pronašli pripadnike rodova *Streptomyces* (25%), *Micrococcus* (16%), *Rhodococcus* (10%), *Pseudomonas* (9%), *Agrobacterium* (8%), *Lysobacter* (6%), *Paenibacillus* (5%) i nekih drugih manje zastupljenih rodova. U ovom

istraživanju su također pronađeni predstavnici većine navedenih rodova, ali su bili zastupljeni s manjim udjelom izolata u banci. Stoga bi se u nastavku istraživanja, s ciljem determinacije još većeg broja izolata iz većeg broja skupina, trebao koristiti veći broj različitih hranjivih podloga. Također, prilikom uzgoja u budućnosti treba izbjeći pregusto nasađivanje bakterija na krute hranjive podloge. S obzirom na prevladavanje brzorastućih bakterija iz koljena Firmicutes u banci izolata Markovog ponora, može se pretpostaviti da su prilikom inicijalnog uzgoja one prerasle sporije rastuće sojeve i da su oni posljedično izgubljeni iz kolekcije. Zaključno, značajno podudaranje pronađenih izolata iz Slovenije s onima iz Markovog ponora nije iznenađujuće, s obzirom da je u oba slučaja riječ o ekosustavu dinarskog krškog podzemlja. Mogući razlozi postojećih razlika su razlike u mikroklimatskim uvjetima svakog istraživnog speleološkog objekta, kao i razlike u tehnikama uzorkovanja i obrade samih uzoraka.

Nadalje, u ovom su istraživanju nađeni bliski srodnici mnogih zanimljivih bakterijskih vrsta koje do sada nisu zabilježene u Dinarskom krškom podzemlju već u drugim ekstremnim staništima. Jedan od njih je izolat 3.23 koji je na razini 16S sekvence pokazao 99%-tnu homologiju s vrstom *Bacillus subterraneus*, izoliranom iz dubokog termalnog bunara u Australiji (Kanso, Greene i Patel, 2002). Slijedeći interesantan predstavnik roda *Bacillus* čiji su srodnici pronađeni u Markovom ponoru je *B. mojavensis* (Roberts, Nakamura i Cohan, 1994), originalno pronađen u pustinjском tlu, a u ovom radu na mikrostaništu s najmanjom količinom vode (1. mikrostanište). Po pet izolata je bilo homologno s bacilima originalno izoliranim s kriogenih tuba pri sakupljanju uzoraka zraka s visine do 41 km – *B. aerius/stratosphericus/altitudinis* (Shivaji i sur., 2006) i *B. aryabhatai* (Shivaji i sur., 2009). Zanimljivi su i predstavnici roda *Exiguobacterium* – *E. sibiricum* (Rodrigues i sur., 2006) originalno pronađen u sibirskom permafrostu i *E. undae* izoliran iz slatkovodnog biofilma u jezeru na Antarktici (Frühling i sur., 2002). Ovakvi nalazi potvrđuju da je krško podzemlje ekstremno stanište, kao i izvor velike mikrobne bioraznolikosti koju treba nastaviti istraživati.

Valja napomenuti da se tek 1% mikroba iz okoliša može uzgojiti u kulturi, dok se informacije o ostalih 99% mogu dobiti posredno – analizom njihovih makromolekula (Kellenberger, 2001). Stoga je u nekim novijim istraživanjima mikrobne raznolikosti krškog podzemlja korišten metagenomski pristup, odnosno

autori nisu uzgajali prisutne mikrobe već su izolirali ukupnu DNA iz mikrobne biomase i sekvencirali prisutne gene za 16S rRNA (Pašić i sur., 2010; Pleše i sur., 2016) i gene koji kodiraju za proteine (*fusA*, *rplB*, *leuS*, *recG* i *pyrG*) (Pleše i sur., 2016). Temeljem tako dobivenih rezultata Pleše i sur. (2016) pokazali su da su na istraživanim lokalitetima (pet Dinarskih krških špilja na području Hrvatske) prevladavale bakterije iz skupina Nitrospirae, Alphaproteobacteria i Firmicutes, dok su u istraživanju Pašić i sur. (2010) prevladavale bakterije iz skupina Gammaproteobacteria, Actinobacteria i Nitrospirae (područje Slovenije). Osim toga, u oba su istraživanja pronađene sekvence koje spadaju u nove, do sada nekultivirane skupine bakterija, čime su ukazali na raznolikost i jedinstvenost mikrobnih zajednica krških podzemnih ekosustava. Slična bi se istraživanja (metagenomski pristup) u budućnosti trebala provesti na većem broju uzoraka s različitih lokacija krškog podzemlja. Na taj bi se način dobio uvid u ukupnu bioraznolikost mikrobnih zajednica na području Dinarskog krša. Međutim, podaci o rezistenciji i druge laboratorijske analize mogu se provesti jedino uzgojem mikroorganizama na hranjivim podlogama, tako da je pristup korišten u ovom radu nezamjenjiv u modernim mikrobiološkim istraživanjima.

5.3. Voda kao dominantni ekološki faktor u Dinarskom krškom podzemlju

Mikrobne zajednice podzemlja odlikuju se raznolikošću te su iznimno heterogene. Njihova raznolikost ovisi o uvjetima na mikrostaništu. Primjerice, istraživanja su dokazala značajne razlike u sastavu mikrobnih zajednica unutar istog špiljskog sustava koje mogu biti posljedica sastava stijene, unosa i protoka organske tvari, razlika u strujanju i vlažnosti zraka te i procjeđivanju vode (Barton i Northup, 2007; Shabarova, Widmer i Pernthaler, 2013).

Ovim je istraživanjem pokazano da količina vode u staništu značajno utječe na sastav obraštajnih bakterija: neki su rodovi pronađeni samo na kongerijama izvađenim iz vode (uglavnom predstavnici Actinobacteria), dok su drugi pronađeni samo na špiljskom higropetrikumu (*Agromyces*, *Agrobacter*, *Chryseobacterium*) ili na zraku (*Exiguobacterium*). Tri analizirana tipa mikrostaništa nisu pokazivala velike razlike u broju zabilježenih vrsta (od 19 na 3. mikrostaništu – voda do 23 na 2. mikrostaništu – higropetrikum), niti u broju zabilježenih rodova (10 na 2. i 3.

mikrostaništu te 8 na 1. mikrostaništu – zrak). No, zabilježena je poprilična razdvojenost 3. tipa mikrostaništa od ostalih stanišnih tipova: osim 4 roda „ubikvista“, niti jedan rod se nije preklapao s onima zabilježenim na 1. i 2. mikrostaništu. Razlog tome vjerojatno je značajna razlika fizikalno-kemijskih i ostalih parametara u vodenom okolišu naspram mikrostaništa na zraku (1. mikrostanište) ili vlažnoj stijeni (higropetrik, 2. mikrostanište koje je ujedno i prijelazni oblik). Voda koja prihranjuje sifonska jezera u Markovom ponoru u razdoblju bez plavljenja vodama iz Like značajno je različite temperature (uglavnom hladnija) te su vjerojatno prisutne i razlike u drugim fizikalno-kemijskim i biološkim parametrima vode, uključujući i sam sastav mikrobnih zajednica (OIKON i Elektroprojekt, 2016). Uzorkovanje u ovom istraživanju provedeno je u listopadu 2016. godine, četiri mjeseca nakon zadnjeg plavljenja ponora vodama iz rijeke Like (OIKON i Elektroprojekt, 2016) te bi za dobivanje detaljnijeg uvida u sastava i promjene mikrobnih zajednica na svim tipovima analiziranih mikrostaništa bilo potrebno uzeti uzorke u nekoliko vremenskih točaka nakon plavljenja (neposredno nakon plavljenja i svaki mjesec nakon plavljenja).

5.4. Rezistencija na antibiotike prisutna je u podzemnom staništu bez značajnog antropogenog utjecaja

U mnogim istraživanjima je pokazano da je rezervoar gena za antibiotsku rezistenciju prisutan i u mikroorganizmima koji žive na staništima s minimalnim antropogenim utjecajem, poput Markovog ponora. Primjerice, bakterije izolirane iz nezagađenog tla na Aljasci sadržavale su gene za rezistenciju na β -laktamaze (Allen i sur., 2009). Nadalje, uzgojeni mikrobnii izolati iz špilje Lechuguilla (Novi Meksiko) (Bhullar i sur., 2012) ili sedimenta na dubini većoj od 150 m (Brown i Balkwill, 2009) bili su rezistentni na razne klase antibiotika. Stoga banka izolata Markovog ponora testirana na osam antibiotika koji pripadaju različitim skupinama antimikrobnih spojeva i imaju različite mehanizme djelovanja. Ampicilin i cefotaksim inhibiraju sintezu staničnog zida, tetraciklin, eritromicin, kanamicin i kloramfenikol imaju negativan učinak na sintezu proteina, dok ciprofloksacin i trimetoprim djeluju na razini sinteze nukleinskih kiselina (Bedenić, 2009).

Gram negativne bakterije su u banci izolata Markovog ponora uglavnom bile iz roda *Pseudomonas* za koje je poznato da su intrinzično rezistentne na mnoge antibiotike, ali i imaju vrlo plastičan genom te lako primaju dodatne gene za rezistenciju horizontalnim transferom (Livermore, 2002). Tako je i u drugim studijama pronađeno da su okolišni izolati iz roda *Pseudomonas* gotovo uvijek rezistentni na AMP, CEF i ERI (Iliev i sur., 2015).

Što se tiče Gram pozitivnih izolata, ovdje predstavljeni rezultati uglavnom su u skladu s podacima Bhullara i sur. (2012) za Gram pozitivne izolate iz špilje koja je 4 milijuna godina bila izolirana od utjecaja čovjeka. Jedino značajno odstupanje je primijećeno kod rezistencija na CIP – u ovoj studiji je pronađeno čak 42% rezistentnih izolata, dok u studiji Bhullara i sur. (2012) nije nađen niti jedan. Međutim, ovo se neslaganje može objasniti time što su u toj studiji za testiranje rezistencije na CIP koristili 4 puta veću koncentraciju antibiotika nego što je korištena u ovom radu.

U studiji Browna i Balkwilla (2009) istražena je rezistencija izolata iz dubokog sedimenta, koji nikad nisu izloženi antropogenom utjecaju, na 13 različitih antibiotika. Identificirani izolati pripadali su istim skupinama koje su obrađene i u ovom radu, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria i Bacteroidetes, i 90% ih je bilo rezistentno na barem jedan testirani antibiotik što se također podudara s rezultatima ovog istraživanja.

Zaključno, ovaj rad donosi prva saznanja o antibiotskoj rezistenciji u Dinarskom krškom podzemlju. Dobiveni rezultati su usporedivi s drugim sličnim studijama antibiotske rezistencije u čistim staništima, relativno izoliranim od antropogenog utjecaja. Ukoliko u budućnosti dođe do porasta rezistencije na antibiotike to će biti indikacija negativnog antropogenog utjecaja odnosno zagađenja antibioticima procjednim vodama.

6. ZAKLJUČCI

U ovom je radu po prvi puta istražen sastav uzgojivih obraštajnih mikrobnih zajednica krškog podzemlja s minimalnim antropogenim utjecajem (Lokalitet Markov ponor), s naglaskom na prisutnost rezistencije na antibiotike u prikupljenih 99 bakterijskih izolata. Glavni zaključci ovog istraživanja su:

- ✓ MALDI-TOF MS je brza i jeftina metoda čiji su se rezultati determinacije izolata iz Markovog ponora velikim dijelom podudarali s rezultatima sekvencioniranja 16S-rDNA amplikona i filogenetske analize, kao "zlatnog standarda" taksonomske klasifikacije bakterija.
- ✓ Dodatak masenih spektara izolata iz Markovog ponora u MALDI-TOF MS bazu Instituta Ruđer Bošković olakšati će naknadna istraživanja mikrobnih zajednica Dinarskog krša, odnosno omogućiti će brzo razlikovanje ranije pronađenih od novih izolata.
- ✓ Sastav izolata pokazao je preklapanja sa izolatima sa područja Slovenije što je i očekivano s obzirom da svi pripadaju ekosustavu dinarskog krškog podzemlja.
- ✓ Pronađene su mnoge zanimljive bakterijske vrste koje do sada nisu zabilježene u Dinarskom krškom podzemlju i karakteristične su za ekstremna staništa, poput *Bacillus subterraneus*, *B. mojavensis*, *B. aerius/stratosphericus/altitudinis* i *B. aryabhatai* te *Exiguobacterium sibiricum* i *E. undae*.
- ✓ Količina vode je imala značajan utjecaj na sastav obraštajnih bakterija: neki su rodovi pronađeni samo na kongerijama izvađenim iz vode (uglavnom predstavnici aktinobakterija), dok su drugi pronađeni na špiljskom higropetrikumu (*Agromyces*, *Agrobacter*, *Chryseobacterium*) ili na zraku (*Exiguobacterium*). Prema prisutnim rodovima, izolati iz vode pokazali su izraženu razdvojenost od ostalih stanišnih tipova: osim 4 roda „ubikvista“, niti jedan rod se nije preklapao s onima zabilježenim na ostalim mikrostaništima (zrak i higropetrik), najvjerojatnije zbog značajne razlike u fizikalno-kemijskim parametrima i temperaturi na ovom mikrostaništu naspram ostalih.
- ✓ Udio izolata rezistentnih na različite klase antibiotika odgovarao je drugim relativno izoliranim staništima. Stoga se može pretpostaviti da u ovom staništu

do sada nije bilo značajnog zagađenja vodama antropogenog porijekla koje sadrže antibiotike.

Zaključno, opisano istraživanje daje osnovu za buduća istraživanja mikrobnih zajednica dinarskog krškog podzemlja. Standardizirano uzorkovanje i analiza sastava mikrobnih zajednica uz izradu baze referentnih stanja, trebala bi postati osnova monitoringa stanja podzemnih ekosustava u dinarskom kršu te osnova za praćenje utjecaja antropogenih promjena poput hidrotehničkih zahvata, zagađenja i klimatskih promjena.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se Zrinki Mesić na omogućavanju i organizaciji uzorkovanja i Sanji Puljas na uzimanju uzoraka.

Veliko hvala Snježani Kazazić i Ani Šimatović s Instituta Ruđer Bošković na omogućenoj realizaciji eksperimenta i vrlo ugodnoj atmosferi.

Također se zahvaljujem Lidiji Buzuk, Lidiji Šver i kolegicama Nives Marčina, Karli Orlić i Dunji Šikić na velikoj pomoći u laboratoriju.

Želim se zahvaliti i Ivani Babić koja mi je otvorila vrata bioinformatički te također hvala Sanji Faivre i Ani Ostojić na preporuci literature.

Za kraj, neopisivo hvala mojim mentoricama Ani Bielen i Sandri Hudina bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

Za ovaj rad korišteni su podaci prikupljeni tijekom projekta Provođenje recentnih biospeleoloških istraživanja na području Lipovog polja koje su 2016. godine proveli Oikon d.o.o. – Institut za primijenjena istraživanja i Elektroprojekt d.d. koje je financirala Hrvatska elektroprivreda d.d.

8. POPIS LITERATURE

- Allen H.K., Moe L.A., Rodbumrer J., Gaarder A. i Handelsman J. (2009) Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *The ISME Journal* **3**, 243–251.
- Andersen T., Baranov V., Hagenlund L.K., Ivković M., Kvifte G.M. i Pavlek M. (2016) Blind Flight? A new troglobiotic orthoclad (Diptera, Chironomidae) from the Lukina Jama-Trojama cave in Croatia. *PLoS ONE* **11**, e0152884.
- Andersson D.I. i Hughes D. (2014) Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature reviews. Microbiology* **12**, 465–478.
- Angelakis E., Yasir M., Azhar E.I., Papadioti A., Bibi F., Aburizaiza A.S., i ostali (2014) MALDI-TOF mass spectrometry and identification of new bacteria species in air samples from Makkah, Saudi Arabia. *BMC Research Notes* **7**, 892.
- Barton H.A. (2006) Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies* **68**, 43–54.
- Barton H.A. i Northup D.E. (2007) Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies* **69**, 163–178.
- Bedek J., Gottstein Matočec S., Jalžić B., Ozimec R. i Štamol V. (2006) Catalogue of cave type localities of Croatian fauna. *Natura Croatica* **15**, 1-154.
- Bedenić B. (2009) Antibakterijski lijekovi. U: *Medicinska mikrobiologija*. (Ed. S. Uzunović-Kamberović), str. 221–251. Štamparija Fojnica d.o.o, Zenica.
- Bhullar K., Waglechner N., Pawlowski A., Koteva K., Banks E.D., Johnston M.D., i ostali (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE* **7**, e34953.
- Bilandžija H., Čuković T. i Puljas S. (2014) Protokol praćenja stanja vrsta *Congeria kusceri* Bole, 1962 i *Congeria jalzici* Morton & Bilandžija, 2013 u Republici Hrvatskoj. Hrvatsko biospeleološko društvo, Zagreb.
- Bilandžija H., Morton B., Podnar M. i Cetković H. (2013) Evolutionary history of relict *Congeria* (Bivalvia: Dreissenidae): unearthing the subterranean biodiversity of the Dinaric Karst. *Frontiers in Zoology* **10**, 1-17.

- Biondić B. i Biondić R. (2014) Hydrogeology of the Dinaric Karst in Croatia. Geotehnički fakultet, Varaždin, 341 str.
- Bissett A., Brown M. V., Siciliano S.D. i Thrall P.H. (2013) Microbial community responses to anthropogenically induced environmental change: Towards a systems approach. *Ecology Letters* **16**, 128–139.
- Böhme K., Fernández-No I.C., Pazos M., Gallardo J.M., Barros-Velázquez J., Cañas B., i ostali (2013) Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis* **34**, 877–887.
- Brown M.G. i Balkwill D.L. (2009) Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microbial Ecology* **57**, 484–493.
- Culver D.C. i Pipan T. (2009) The biology of caves and other subterranean habitats. Oxford University Press, Oxford, 272 str.
- Culver D.C. i Sket B. (2000) Hotspots of subterranean biodiversity in caves and wells. *Journal of Cave and Karst Studies* **62**, 11–17.
- Dashti A.A., Jadaon M.M., Abdulsamad A.M. i Dashti H.M. (2009) Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal* **41**, 117–122.
- Dattagupta S., Schaperdoth I., Montanari A., Mariani S., Kita N., Valley J.W., i ostali (2009) A novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *The ISME Journal* **3**, 935–943.
- EUCAST (2003) Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection* **9**, 1–7.
- Ford D. i Williams P. (2007) Karst Hydrogeology and Geomorphology. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, 554 str.
- Frühling A., Schumann P., Hippe H., Sträubler B., Stackebrandt E. i Stra B. (2002) *Exiguobacterium undae* sp. nov. and *Exiguobacterium antarcticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 1171–1176.

- Gaston K.H. i David R. (1994) Hotspots across Europe. *Biodiversity Letters* **2**, 108–116.
- Gillan D.C. i De Ridder C. (1997) Morphology of a ferric iron-encrusted biofilm forming on the shell of a burrowing bivalve (Mollusca). *Aquatic Microbial Ecology* **12**, 1–10.
- Gillings M.R., Gaze W.H., Pruden A., Smalla K., Tiedje J.M. i Zhu Y.-G. (2015) Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* **9**, 1269–79.
- Gottstein S. (2010) Priručnik za određivanje podzemnih staništa u Hrvatskoj prema Direktivi o staništima EU. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 99 str.
- Gottstein Matočec S., Ozimec R., Jalžić B., Kerovec M. i Bakran-Petricioli T. (2002) Raznolikost i ugroženost podzemne faune Hrvatske. Ministarstvo zaštite okoliša i prostornog uređenja, Zagreb, 82 str.
- Gouy M., Guindon S. i Gascuel O. (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 221–224.
- Hall T., Biosciences I. i Carlsbad C. (2011) BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences* **2**, 60–61.
- Iliev I., Marhova M., Gochev V., Tsankova M. i Trifonova S. (2015) Antibiotic resistance of gram-negative benthic bacteria isolated from the sediments of Kardzhali Dam (Bulgaria). *Biotechnology and Biotechnological Equipment* **29**, 274–280.
- Janda J.M. i Abbott S.L. (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 2761–2764.
- Jovanović Glavaš O., Jalžić B. i Bilandžija H. (2017) Population density, habitat dynamic and aerial survival of relict cave bivalves from genus *Congeria* in the Dinaric karst. *International Journal of Speleology* **46**, 13–22.

- Justesen U.S., Skov M.N., Knudsen E., Holt H.M., Søgaard P. i Justesen T. (2010) 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* **48**, 946–948.
- Kanso S., Greene A.C. i Patel B.K.C. (2002) *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 869–874.
- Katoh K. i Standley D.M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 772–780.
- Kellenberger E. (2001) Exploring the unknown. The silent revolution of microbiology. *EMBO Reports* **2**, 5–7.
- Knapp C.W., Dolfing J., Ehlert P.A.I. i Graham D.W. (2010) Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science and Technology* **44**, 580–587.
- Lane D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. U: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic (ur. Stackebrandt E. i Goodfellow M). John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Lavigne J.P., Espinal P., Dunyach-Remy C., Messad N., Pantel A. i Sotto A. (2013) Mass spectrometry: A revolution in clinical microbiology? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **51**, 257–270.
- Lay J.O. (2001) MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* **20**, 172–194.
- Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.-Y. i Kim Y.H. (2012) Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of visualized experiments: JoVE*, 1–5.
- Lee Y., Park J., Rhee O. i Lee G. (2014) Identification of Waterborne Microbial Pathogens by Mass Spectrometry and the Biotyper 2.0 Databases. **8**, 3525–3530.

- Letunic I. i Bork P. (2016) Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research* **44**, gkw290.
- Livermore D.M. (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases* **34**, 634–640.
- Martin J.F. i Liras P. (1989) Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annual Reviews in Microbiology* **43**, 173–206.
- Martinez J.L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* **157**, 2893–2902.
- Megušar F. i Sket B. (1977) On the nature of some organic covers on the cave walls. U: *Proceedings of the 6th international congress of Speleology, International Union of Speleology, Academia*. str. 159–161.
- Morton B., Velkovich F. i Sket B. (1998) Biology and anatomy of the „living fossil“ *Congeria kusceri* (Bivalvia : Dreissenidae) from subterranean rivers and caves in the Dinaric karst of the former Yugoslavia. *Journal of Zoology* **245**, 147–174.
- Mulec J. (2008) Microorganisms in hypogean: Examples from Slovenian karst caves. *Acta Carsologica* **37**, 153–160.
- Mulec J., Oarga-Mulec A., Tomazin R. i Matos T. (2015) Characterization and fluorescence of yellow biofilms in karst caves, southwest Slovenia. *International Journal of Speleology* **44**, 107–114.
- OIKON i Elektroprojekt (2016) Provođenje recentnih biospeleoloških istraživanja na području Lipovog polja. naručitelj HEP, Zagreb, 286 str.
- Ozimec R., Bedek J., Gottstein S., Jalžić B., Rajko Slapnik R., Štamol V., i ostali (2009) Crvena Knjiga špiljske faune Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb, 363 str.
- Pašić L., Kovče B., Sket B. i Herzog-Velikonja B. (2010) Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology* **71**, 50–60.

- Patel V., Munot H., Shouche Y.S. i Madamwar D. (2014) Response of bacterial community structure to seasonal fluctuation and anthropogenic pollution on coastal water of Alang-Sosiya ship breaking yard, Bhavnagar, India. *Bioresource Technology* **161**, 362–370.
- Pleše B., Pojskić N., Ozimec R., Mazija M., Četković H. i Lukić-Bilela L. (2016) Molecular Characterization of Aquatic Bacterial Communities in Dinaric Range Caves. *Water Environment Research* **88**, 617–630.
- Poulain A.J., Aris-Brosou S., Blais J.M., Brazeau M., Keller W. (Bill) i Paterson A.M. (2015) Microbial DNA records historical delivery of anthropogenic mercury. *The ISME Journal* **9**, 1–10.
- Roberts M.S., Nakamura L.K. i Cohan F.M. (1994) *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**, 256–264.
- Rodrigues D.F., Goris J., Vishnivetskaya T., Gilichinsky D., Thomashow M.F. i Tiedje J.M. (2006) Characterization of *Exiguobacterium* isolates from the Siberian permafrost. Description of *Exiguobacterium sibiricum* sp. nov. *Extremophiles* **10**, 285–294.
- Ronquist F. i Huelsenbeck J.P. (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Santos I.C., Hildenbrand Z.L. i Schug K.A. (2016) Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *The Analyst* **141**, 2827–2837.
- Shabarova T., Widmer F. i Pernthaler J. (2013) Mass effects meet species sorting: Transformations of microbial assemblages in epiphreatic subsurface karst water pools. *Environmental Microbiology* **15**, 2476–2488.
- Shivaji S., Chaturvedi P., Suresh K., Reddy G.S.N., Dutt C.B.S., Wainwright M., i ostali (2006) *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 1465–1473.

- Shivaji S., Chaturvedi P., Begum Z., Pindi P.K., Manorama R., Padmanaban D.A., i ostali (2009) *Janibacter hoylei* sp. nov., *Bacillus isronensis* sp. nov. and *Bacillus aryabhatai* sp. nov., isolated from cryotubes used for collecting air from the upper atmosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2977–2986.
- Simon K.S. (2008) Frontiers of Karst Research. In: *Frontiers of Karst Research*, Special Pu. (ur. Martin J.B. i White W.B.), Karst Waters Institute, Leesburg, Virginia.
- Sket B. (1999) The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and Conservation* **8**, 1319–1338.
- Sket B. (2005) Dinaric karst, diversity. U: *Encyclopaedia of caves* (ur. Culver D.C. i White W.B.), Elsevier Academic Press, Oxford, str. 158–165.
- Topić Popović N., Kazazić S.P., Strunjak-Perović I. i Čož-Rakovac R. (2016) Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. *Environmental Research* **152**, 7–16.
- Topić Popović N., Kazazić S.P., Strunjak-Perović I., Barišić J., Sauerborn Klobučar R., Kepec S., i ostali (2015) Detection and diversity of aeromonads from treated wastewater and fish inhabiting effluent and downstream waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **120**, 235–242.
- Vaz-Moreira I., Nunes O.C. i Manaia C.M. (2014) Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: Searching the links with the human microbiome. *FEMS Microbiology Reviews* **38**, 761–778.
- Velikonja B.H., Tkavc R. i Pašić L. (2014) Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of macroscopic microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia. *International Journal of Speleology* **43**, 45–56.
- Vörös J., Márton O., Schmidt B.R., Gál J.T., Jelić D., Culver D., i ostali (2017) Surveying Europe's Only Cave-Dwelling Chordate Species (*Proteus anguinus*) Using Environmental DNA. *PLOS ONE* **12**, e0170945.
- Vos M., Quince C., Pijl A.S., de Hollander M. i Kowalchuk G.A. (2012) A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PLoS ONE* **7**, 1–8.

Wilkins H., Culver D.C. i Humphreys W.F. (2001) Subterranean ecosystems. Elsevier, 791 str.

Woegerbauer M., Zeinzinger J., Gottsberger R.A., Pascher K., Hufnagl P., Indra A., i ostali (2015) Antibiotic resistance marker genes as environmental pollutants in GMO-pristine agricultural soils in Austria. *Environmental Pollution* **206**, 342–351.

9. SAŽETAK

U ovom je radu po prvi puta istražen sastav obraštajnih mikrobnih zajednica krškog podzemlja s minimalnim antropogenim utjecajem, s naglaskom na prisutnost rezistencije na antibiotike u prikupljenim bakterijskim izolatima. Unatoč tome što Dinarski krški podzemni ekosustavi predstavljaju veliku prirodnu vrijednost za Hrvatsku, njihove mikrobne zajednice, koje čine osnovu hranidbenih mreža u oligotrofnim podzemnim ekosustavima, većinom su neistražene. Stoga je u ovom radu za mjesto uzorkovanja odabran podzemni lokalitet u Dinarskom kršu, Markov ponor (Lipovo polje, Hrvatska), za kojeg je u ranijim istraživanjima pokazano da nije zagađen i koji stoga može poslužiti za opis antropogeno-netaknute mikrobne zajednice iz krškog podzemlja. Kako bi se sakupio što veći broj različitih bakterijskih izolata, uzeti su obrisci biofilmova sa kolonija špiljskih školjkaša *Congerina jalzici*, kao mikrolokacija s povećanom količinom hranjivih tvari. Prva banka bakterijskih izolata Markovog ponora sadrži 99 izolata koji su taksonomski determinirani dvama molekularnim metodama: MALDI-TOF masenom spektrometrijom i sekvencioniranjem 16S-rDNA amplikona s filogenetskom analizom. Među izolatima su prevladavale bakterije iz koljena Firmicutes (71,1%), zatim Proteobacteria (razred Gammaproteobacteria) (15,1%), Actinobacteria (12,1%) i Bacteroidetes (1,01%). Utvrđeno je da količina vode u staništu značajno utječe na sastav obraštajnih bakterija: neki su rodovi pronađeni samo na kongerijama izvađenim iz vode (uglavnom predstavnici aktinobakterija), dok su drugi pronađeni na špiljskom higropetrikumu (*Agromyces*, *Agrobacter*, *Chryseobacterium*) ili na zraku (*Exiguobacterium*). Naposljetku, većina bakterijskih izolata (81,8%) bila je rezistentna barem na jedan od osam ispitanih antibiotika, a dva izolata srodna vrstama *Bacillus thuringiensis* i *Pseudomonas helmanticensis* bila su rezistentna na sve ispitane antibiotike. Time je pokazano da je rezervoar gena za antibiotsku rezistenciju prisutan i u staništima s minimalnim antropogenim utjecajem. Zaključno, dobiveni rezultati daju prva saznanja o uzgojivim mikrobnim zajednicama u Markovom ponoru i postavljaju temelje za zaštitu krškog podzemlja od antropogenog utjecaja – ukoliko u budućnosti dođe do porasta rezistencije na antibiotike to će biti indikacija negativnog antropogenog utjecaja.

10. SUMMARY

We have explored the composition of biofilm microbial communities of Dinaric karst subterranean habitat with minimal anthropogenic influence, focusing on antibiotic resistance of collected bacterial isolates. Even though the Dinaric karst underground ecosystems are a significant part of Croatian natural heritage, their microbial communities, which constitute the basis of food chain in oligotrophic subterranean ecosystems, are mostly unexplored. Therefore, Markov ponor (Lipovo polje, Croatia) was chosen as the sampling location, as previous research of this locality showed that it was not polluted and can thus serve to describe anthropogenically-undisturbed microbial community of karst underground. In order to collect the largest variety of bacterial isolates, swabs were collected from *Congerina jalzici* shells, as a microhabitat with increased nutrient availability. First bank of bacterial isolates from Markov ponor contains 99 isolates which were taxonomically determined by two molecular methods: MALDI-TOF mass spectrometry and sequencing of 16S-rDNA amplicons coupled with phylogenetic analysis. Bacteria from phylum Firmicutes (71,1%) dominated among the isolates, followed by Proteobacteria (class Gammaproteobacteria) (15,1%), Actinobacteria (12,1%) and Bacteroidetes (1,01%). It was found that the amount of water within the habitat greatly affects the composition of biofilm bacteria: some genera have been found only on *C. jalzici* that has been taken out of the water (mostly representatives of Actinobacteria), while others were found only on hygropetric (*Agromyces*, *Agrobacter*, *Chryseobacterium*) or on air (*Exiguobacterium*). Finally, the majority of bacterial isolates (81,8%) were found to be resistant to at least one out of eight tested antibiotics, and two of the isolates related to *Bacillus thuringiensis* and *Pseudomonas helmanticensis* were resistant to all of the tested antibiotics. It has thus been shown that the antibiotic resistance-related gene pool exists even in habitats with minimal anthropogenic influence. To conclude, obtained results give the first insights into culturable microbial communities in Markov ponor and can serve as a basis for protecting the karst subterranean habitats from anthropogenic influences – if the increase in antibiotic resistance occurs in the future that will serve as an indication of negative anthropogenic influence.