

Mikrobiologija špilja s područja Istre i Kvarnerskog zaleđa



Slika 1. | Ulazni kanal špilje Bačva. | Foto: Petar Čuček

Petar Čuček^{1,2}, Klara Pauletić¹, Lucija Tomić¹, Nina Trinajstić^{3,4}

¹ Znanstveno edukacijski centar Višnjan, Višnjan

² Astronomsko društvo Višnjan, Višnjan

³ Speleološka udruga „Estavela“, Kastav

⁴ Speleološki klub Ozren Lukić, Zagreb

Cilj ovog rada bio je provesti preliminarna istraživanja brojnosti heterotrofnih mikroorganizama u zraku i na površinama stijena u speleološkim objektima. Istraživanje je provedeno na pet objekata na područja Istre i Kvarnerskog zaleđa koristeći klasične mikrobiološke tehnike (kultivaciju). Rezultati pokazuju trend smanjenja broja bakterija u zraku i na površinama speleoloških objekata s odmicanjem od ulaza, uz odstupanja koja se mogu objasniti pojavama šišmiša, otjecanjima vode, zračnim strujama ili antropogenim utjecajem. Rezultati istraživanja će omogućiti optimizaciju metoda uzorkovanja, uzgoja i određivanja brojnosti bakterija u speleološkim objektima te osnovu za daljnji monitoring mikrobiologije speleoloških objekata.

Ključne riječi: krš, podzemna staništa, mikrobiologija speleoloških objekata, kultivacija, monitoring

Keywords: karst, caves, microbiology of speleological objects, culture-based enumeration

Uvod

Područje krša u Hrvatskoj karakterizira veliki broj speleoloških objekata

koji otvaraju prostor brojnim znanstvenim istraživanjima. Zbog toga je dinarsko područje pogodno mjesto za istraživanja biologije staništa

podzemlja. U Hrvatskoj već se dugi niz godina provode biospeleološka istraživanja, no nema dovoljno istraživanja s područja mikrobiologije

speleoloških objekata (Vuk 2017). Istraživanja s tog područja biospeleologije zanimljiva su i korisna upravo zbog specifičnih ekoloških obilježja, izoliranosti staništa i neistraženosti. U Dinarskom krškom podzemlju, poglavito Sloveniji, do sada je rađeno svega par istraživanja koje se odnose na speleološku mikrobiologiju - analize diverziteta biofilмова (Pašić i sur. 2010; Mulec i sur. 2015) te je načinjena jedna inventarizacija bakterijskog obraštaja školjkaša u Markovom ponoru (Vuk 2017).

Budući da danja svjetlost u špilju ulazi samo na ulazu, fotoautotrofni (mikro)organizmi ne mogu biti primarni proizvođači u ekosustavu unutrašnjosti špilje. Smanjenjem svjetlosti tako dolazi do smanjenja proizvodnje hranjivih tvari fotosintezom, a mala biomasa faune i potpuno odsustvo flore u objektima svrstava ih u oligotrofna staništa. Većina mikrobni zajednica speleoloških objekata oslanja se na dotok organskog materijala vodom ili šišmišima, dok je manji dio ovisan o kemoautotrofnim mikroorganizmima (Candiroglu, B., & Dogruoz Gungor, N., 2017). Ostali ekološki parametri (temperatura i vlaga zraka) su u speleološkim objektima manje više konstantni, izuzev razine podzemnih tekućica. Ekstremni uvjeti povećavaju važnost mikrobioloških istraživanja unutar speleoloških objekata jer nam oni daju priliku za proučavanje potencijalno novih genofondova, različitih vrsta prilagodbi na okoliš te mogućnost pronalaska novih vrsta

mikroorganizama ili novih antimikrobnih tvari.

Površinska zagađenja također mogu utjecati na bioraznolikost mikroorganizama u speleološkim objektima (Vuk, 2017). U eksploatiranim speleološkim objektima može doći i do zagađenja zbog čovjekove aktivnosti (Tomczyk-Žaka & Zielenkiewicza, 2015).

Cilj ovog istraživačkog rada je istražiti mikrobiološke karakteristike pet speleoloških objekata (Bačva, Vela Peć, Šparožna pećina, Vela špilja u krugu te Mala špilja u krugu) te ih međusobno usporediti.

Na osnovi dosadašnjih istraživanja iz područja mikrobiologije speleoloških objekata, postavljene su početne hipoteze. Zbog različitih uvjeta u unutrašnjosti špilje, a samim time i prilagodba samih bakterija do kojih mora doći kako bi opstale u takvom okolišu, pretpostavka je da će izvan objekta biti brojčano više mikroorganizama nego u njemu. Tako će se i udaljavanjem od ulaza, odnosno smanjenjem vanjskog utjecaja njihov broj smanjivati. Ulaskom u mračnije dijelove špilje, dolazi i do smanjivanja danje svjetlosti, stoga je pretpostavljeno da će broj organizama kojima je potrebna svjetlost opadati, dok će se povećavati brojnost onih koji preživljavaju u mraku. Proučavajući karakteristike svake špilje koja je istražena, dolazi se do hipoteze da će u špilji Bačva zbog blizine naselja i aktivne

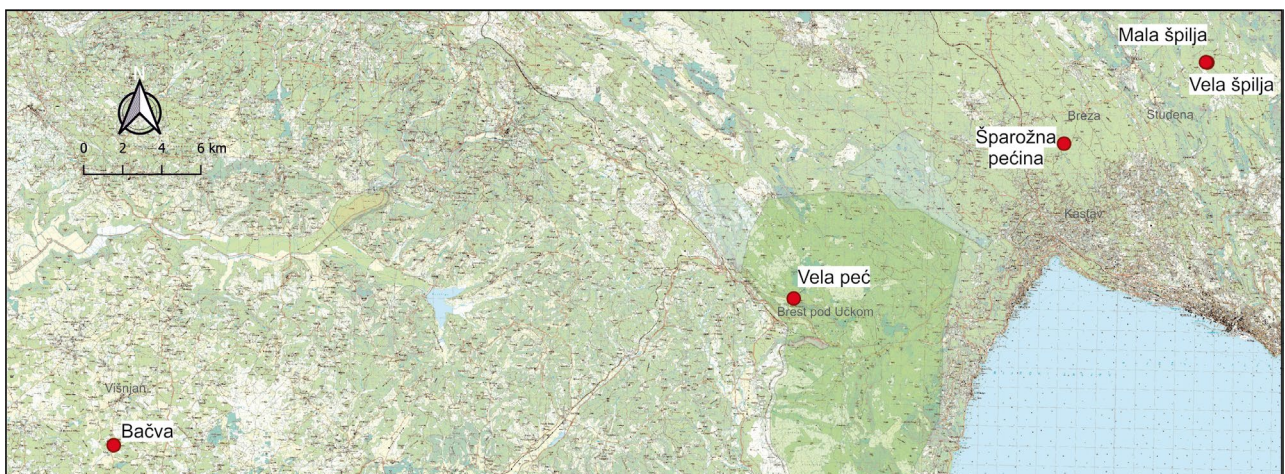
poljoprivrede biti nađeni indikatori onečišćenja, odnosno fekalni koliformi. Osim špilje Bačva pojava fekalnih koliforma očekuje se i u objektima u kojima boravi veći broj šišmiša, te u Šparožnoj pećini koju posjećuju planinari.

Opis lokaliteta

Speleološki objekti u kojima je provedeno istraživanje nalaze se na području Istre i Kvarnerskog zaleđa (Karta 1).

Bačva

Bačva, originalnog naziva Špilja ispod ceste, nalazi se u naselju Bačva, Općina Višnjan u Istri. Špilja je od ranije poznata zbog svoje blizine naselju te je služila kao ilegalno odlagalište otpada i u više navrata je čišćena. Speleološki nacrt su izradili članovi Speleološkog društva „Buje“ 2013. godine, osnovni podatci – duljina: 17 m, dubina: 12 m. Ulaz u objekt se nalazi na rubu poljoprivredne površine uz cestu Višnjan - Bačva. Ulaz karakterizira urušni dio ljevkastog oblika koji se niz kosinu spušta prema ulazu u objekt dimenzija 1 x 3 m (Slika 1). Ulazna kosina vodi u prostranu dvoranu koja završava s dva manja kanala u smjeru SI i JZ koji završavaju suženjem. Objekt je morfološki jednostavan nastao u horizontalno uslojenim donjokrednim vapnencima (Polšak & Šikić, 1963) sa zanimljivim pojavama sedimenta



Karta 1. | Dio topografske karte Hrvatske 1:25000 s označenim lokalitetima speleoloških objekata.



Slika 2. | Kanal špilje Vela peć. | Foto: Petar Čuček, uredio: Gregor Kervina



Slika 3. | Ponor u sedimentu flišnog porijekla na kraju špilje Vela peć s jezerom koje nastaje za vrijeme visokog vodnog režima. | Foto: Petar Čuček, uredio: Gregor Kervina



Slika 4. | Ulaz u Šparožnu pećinu. | Foto: Nina Trinajstić

od kojih su najimpresivniji kemogeni sedimenti u obliku siga zastupljeni duž cijelog objekta (stalaktiti, heliktiti, špiljsko mlijeko, špiljski biseri, kamenice, kaskade, saljevi i koraloidi). U objektu je tijekom istraživanja zamijećen šišmiš i guano, od ostalih organizama nisu zamijećeni troglobionti ali je u cijelom objektu veliki broj skakavaca.

Vela peć

Vela peć se nalazi u blizini naselja Brest pod Učkom u Istri. Špilju je istraživala Speleološka udruga Spelunka, 2003. godine. Osnovni podatci – duljina: 156 m, dubina: 55 m. Ulaz u objekt se nalazi na strmim JZ padinama prema vrhu Šebrn te ga karakterizira veliki ulaz $\approx 5 \times 8$ m. Morfološki je objekt jednostavan te se sastoji od jednog kanala koji se pruža u smjeru SI duž jasno vidljive rasjedne linije. Kanal je velikih dimenzija s visinom od 10 m i širinom do 20 m a završava sitastim ponorom u sitnozrnatom sedimentu uz koji se vide nasipi i kanjon nastao vodenim tokom (Slika 2, Slika 3). Nakon pregleda sedimenta s dna, temeljem sedimentoloških analiza (kalcimetrija, pregled teške i lake frakcije), jasno je vidljivo da su to flišolike naslage koje predstavlja nepropusnu barijeru na dnu objekta gdje se voda sporo procjeđuje kroz sitne pukotine dalje u podzemlje. Ove pojave zabilježene u objektu odgovaraju geologiji područja. Prostor Šebrna nalazi se na kontaktu gornjokrednih vapnenaca (sam vrh) i eocenskih naslaga foraminiferskog vapnenca i fliša (padine) (Šikić & Pleničar, 1967; Šikić & Polšak, 1963). U objektu je zamijećena prisutnost manjeg broja šišmiša te se na nekoliko mjesta u rubnim nišama može pronaći guano. U objektu su u blizini kamenica i na rubnim dijelovima kanala zamijećeni troglobionti, a osim živih organizama pronađene su i kosti brojnih životinja (koza/ovca, konj, mali sisavci).



Slika 5. | Ulazni dio Šparožne pećine s uređenim stepeništem i pod utjecajem vanjskog svjetla.
Foto: Nina Trinajstić

Šparožna pećina

Šparožna pećina se nalazi u Kvarnerskom zaleđu na području između grada Kastva i naselja Breza. Ulaz se nalazi uz šetnicu koju posjećuje veliki broj ljudi. Istraživanje špilje vodila je Speleološka udruga „Estavela“ tijekom više godina te ju i danas redovito obilazi i koristi za speleološku edukaciju. Objekt se može opisati kao razgranatu špilju koja se sastoji od glavnog kanala duljine 317 m koji se pruža u smjeru sjevera te se od njega odvaja

nekoliko kraćih kanala razvijenih u donjokrednim pločastim vapnencima. Slojevi vapnenaca se jasno vide u pojedinim dijelovima objekta gdje je jasno vidljivo i boranje slojeva. Osnovni podatci – duljina: 607 m, dubina: 112 m. Prvi dio špilje je jednostavan za prolaz te je zbog toga bio turistički uređen za vrijeme Austro-ugarske a kroz njega su u kosinama uklesane stepenice (Slika 3, Slika 4). Ulazni dio bio je korišten i od strane talijanske vojske koja je u njemu postavila skladište municije te se u tom periodu špilja značajno

devastirala (Reš, 2010). U objektu se za vrijeme kišnih razdoblja mogu stvoriti nakupine vode u kamenicama u kojima se mogu pronaći i troglobionti. Osim troglobionata špilju koriste i šišmiši te ih se može pronaći u ulaznim dijelovima za vrijeme hibernacije. Špilja je danas službeno zatvorena za posjete javnosti ali zbog blizine puta i neadekvatno zatvorenog ulaza veliki broj posjetitelja posjećuje objekt.

Vela špilja u krugu

Vela špilja u krugu nalazi se u zaleđu izvora Rječine u blizini naselja Studena u općini Klana. Objekt je udaljen od većine planinarskih puteva i jedini posjetioci su speleolozi koji koriste taj teren za speleološku edukaciju nekoliko puta godišnje. Špilja je istražena u tijekom hidrogeološkog kartiranja zaleđa izvora Rječine koje je provodio Institut za geološka istraživanja zajedno sa Speleološkim odsjekom HPD „Željezničar“ tijekom rujna 1996. godine (Kuhta, 2001). Osnovni podatci – dužina: 77 m, dubina: 36 m. Ulaz se nalazi na padinama te je malih dimenzija 1x1 m (Slika 7). Morfološki je to jednostavna špilja s jednim kanalom visine između 2 i 4 m, osim na dijelu gdje mijenja smjer tu se naglo spušta na visinu od 0,5 m te se izlazi u dvoranu iz koje se nastavlja vertikala



Slika 6. | Uzorkovanje u Šparožnoj pećini na točki 11. | Foto: Ozren Milaković



Slika 7. | Ulaz u Vela špilju u krugu i priprema za uzorkovanje brisa površine stijena
Foto: Ozren Milaković



Slika 8. | Jedna od brojnih kamenica s vodom u Veloj špilji u krugu. | Foto: Nina Trinajstić



Slika 9. | Ulaz u Malu špilju u krugu. | Foto: Nina Trinajstić

u završni dio objekta. Voda je prisutna samo u kamenicama ali je ima i u sušnim razdobljima. U objektu nisu primijećeni živi organizmi.

Mala špilja u krugu

Mala špilja u krugu se nalazi 100 m od Vele špilje u krugu i isto je istražena tijekom hidrogeološkog kartiranja zaleđa izvora Rječine (Kuhta, 2001). Osnovni podatci- dužina: 50 m, dubina: 14 m. Dimenzije ulaza 2 x 4 m ali je ulaz urušen te zatrpan fragmentima stijena pa je zapravo ulaz jako uzak nakon čega slijedi skok i nastavak kanala (Slika 9). Špilja je jednostavne morfologije i sastoji se od jednog kanala visine 1 do 2 m. Dno je prekriveno sitnozrnatim sedimentom osim završnog dijela gdje je veći dio prekriven sigama. U objektu nije primijećena cirkulacija zraka i nema vode. Duž cijelog objekta nalazi se veliki broj šišmiša koji objekt koriste za hibernaciju. Zbog prisutnosti šišmiša na većem dijelu špilje može se pronaći guano.

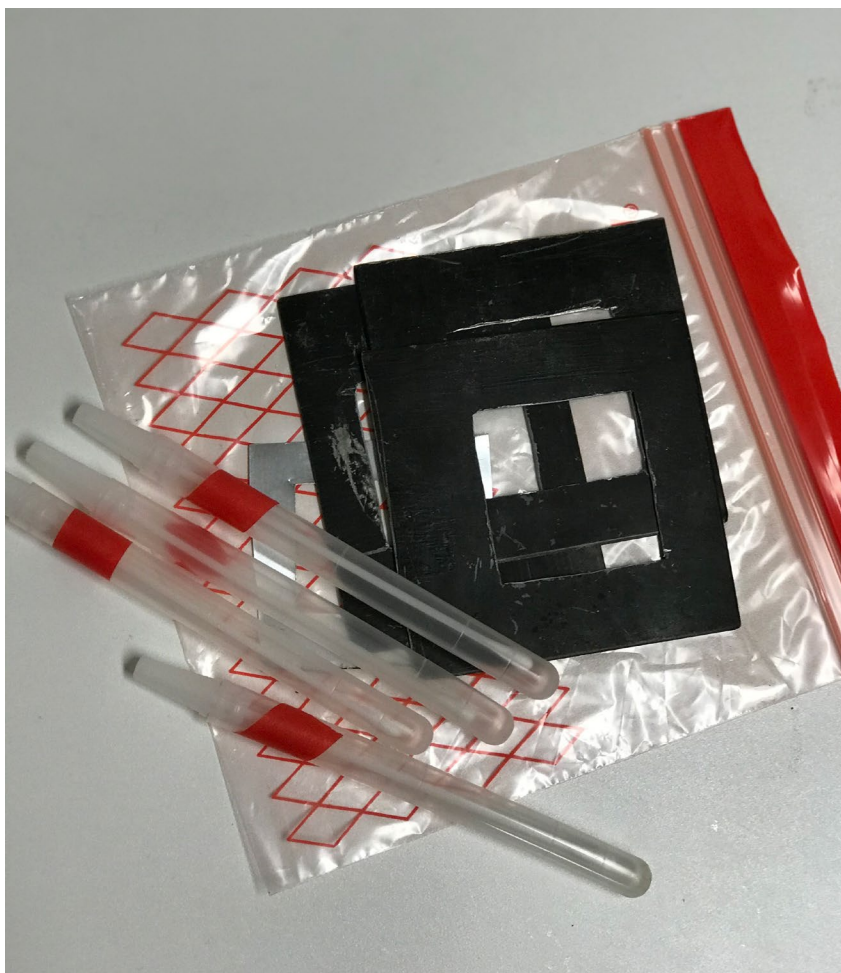
Metodologija

Uzorkovanje zraka i obrisaka stijena

Uzorkovanje zraka provedeno je metodom pasivne (gravitacijske) sedimentacije mikroorganizama na



Slika 10. | Primjeri uzorkovanja zraka na ulazu u speleološke objekte i u objektima | Foto: Nina Trinajstić

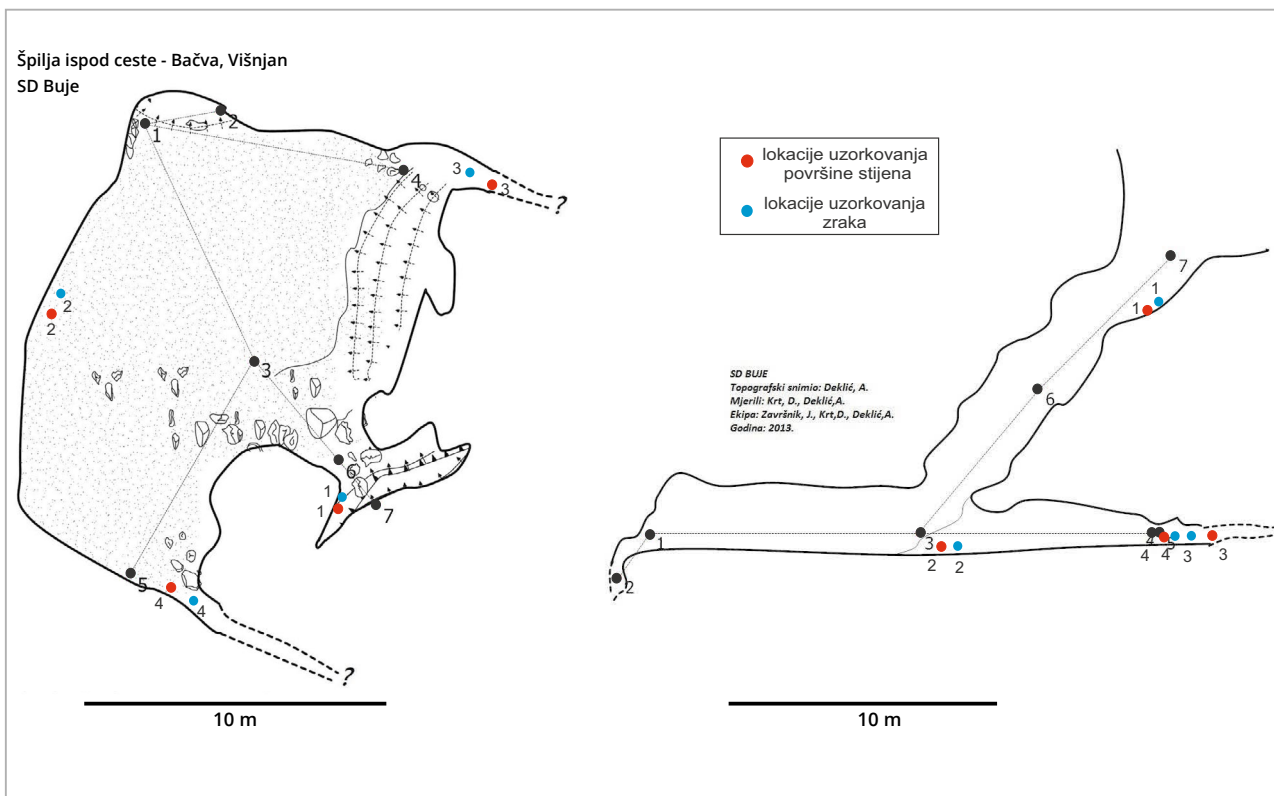


Slika 11. | Metalna šablona i sterilni vateni štapić korišteni za uzorkovanje površine stijena.
Foto: Klara Pauletić

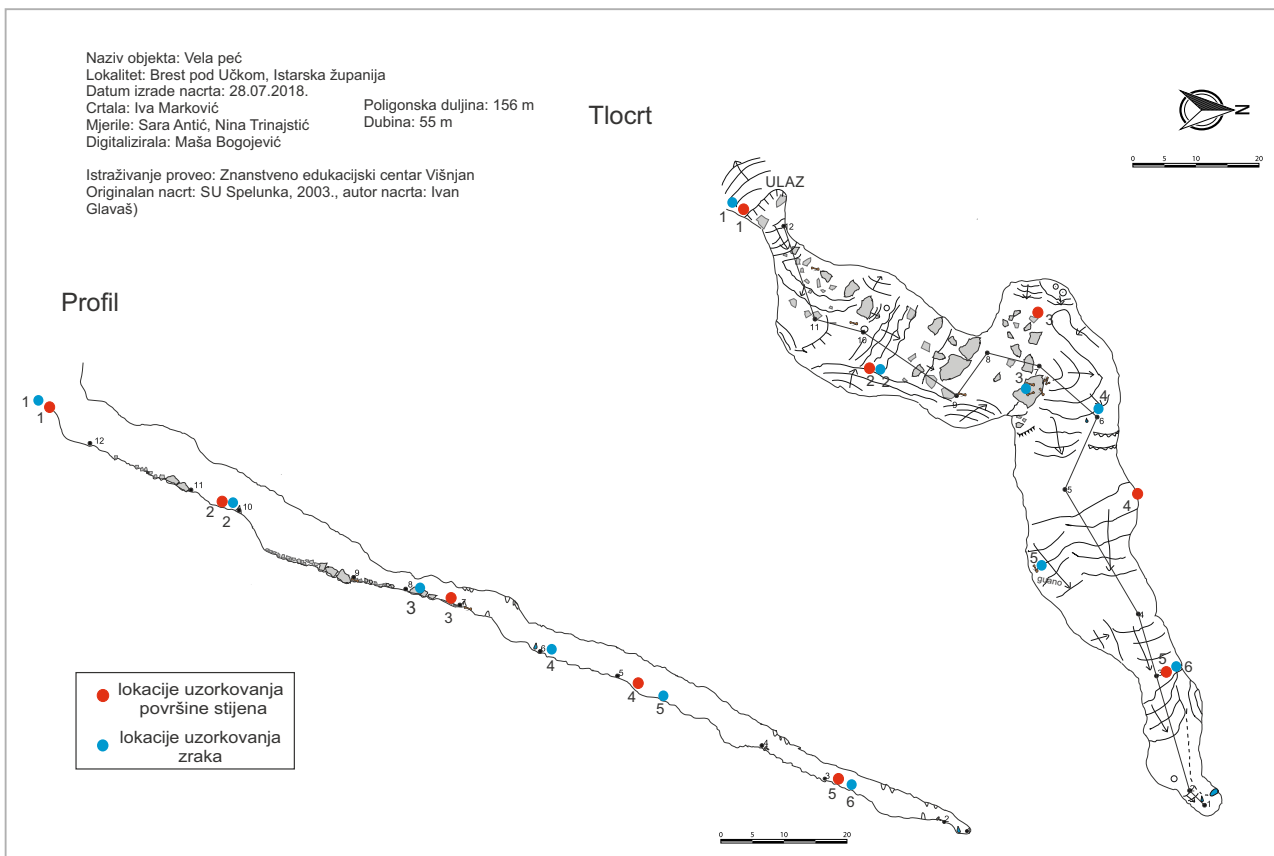
otvorene Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom u trajanju od 30 minuta (Pasquarella i sur. 2000) (Slika 10). Uzorkovanje površinskih mikroorganizama stijena napravljeno je sa sterilnim vatnim štapićem (brisom, Copan) koji je umočen u sterilnu fiziološku otopinu. Uzorkovana površina je ograničena sterilnom metalnom šablonom (5 x 5 cm) (Slika 11). Označeni uzorci su u najkraćem mogućem roku dalje obrađeni (vidi *Obrada uzoraka*).

Mjesto uzorkovanja

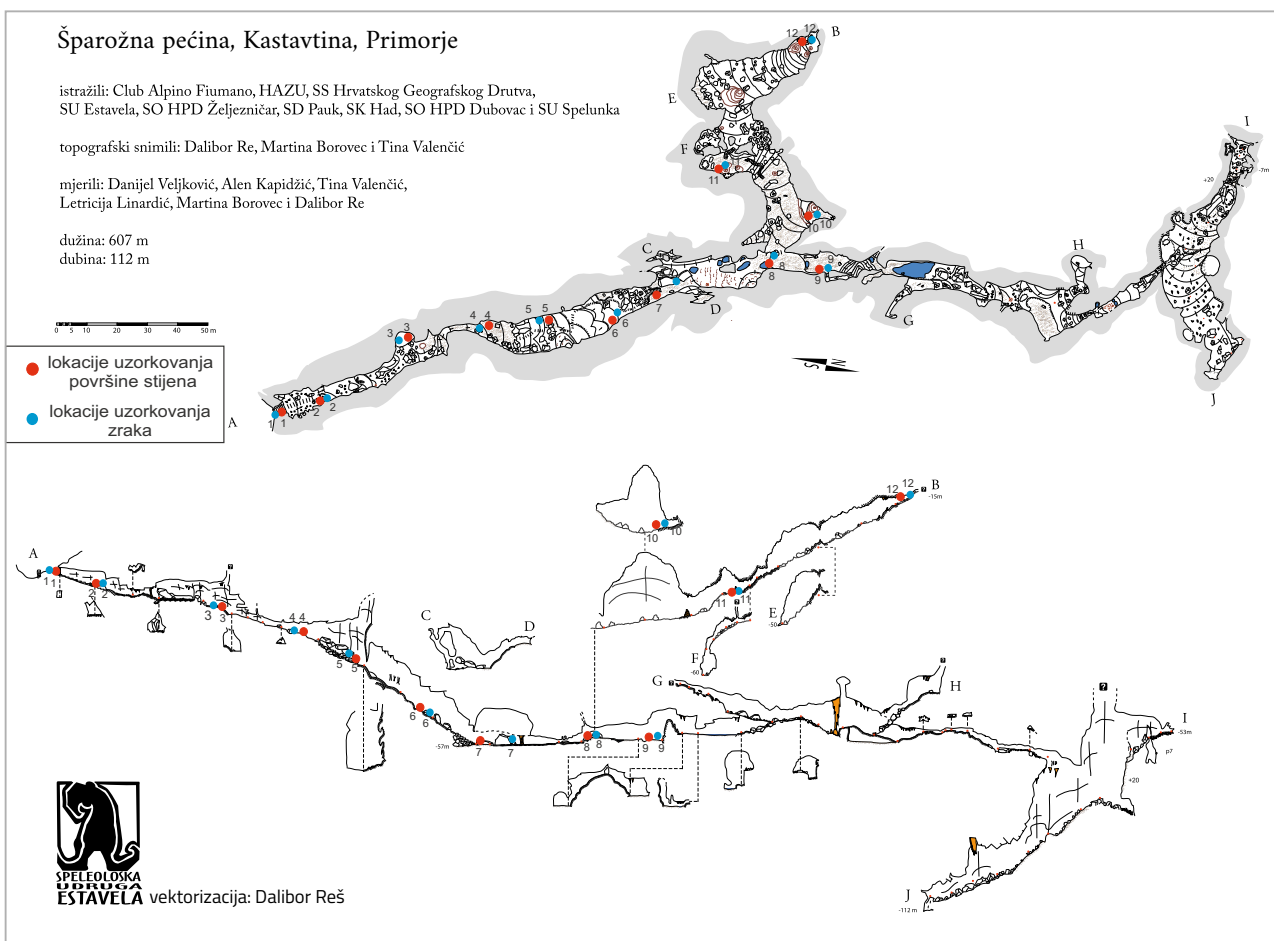
Mjesta uzorkovanja za mikrobiološku analizu pratila su pružanje špijele te su točke odabrana uzimajući u obzir cirkulaciju zraka, moguće zagađenje i mjesta prolaza ljudi te postojanje guana. Na nacrtima špijele označena su mjesta uzorkovanja zraka i brisa stijena. U svim objektima uziman je i uzorak ulaznog dijela pod potpunim utjecajem vanjskim ekoloških uvjeta – dobra cirkulacija zraka, prisutnost svjetlosti, manja vlažnost zraka i veći donos organske tvari. Na svakoj točki određena je temperatura zraka prijenosnim termometrom.



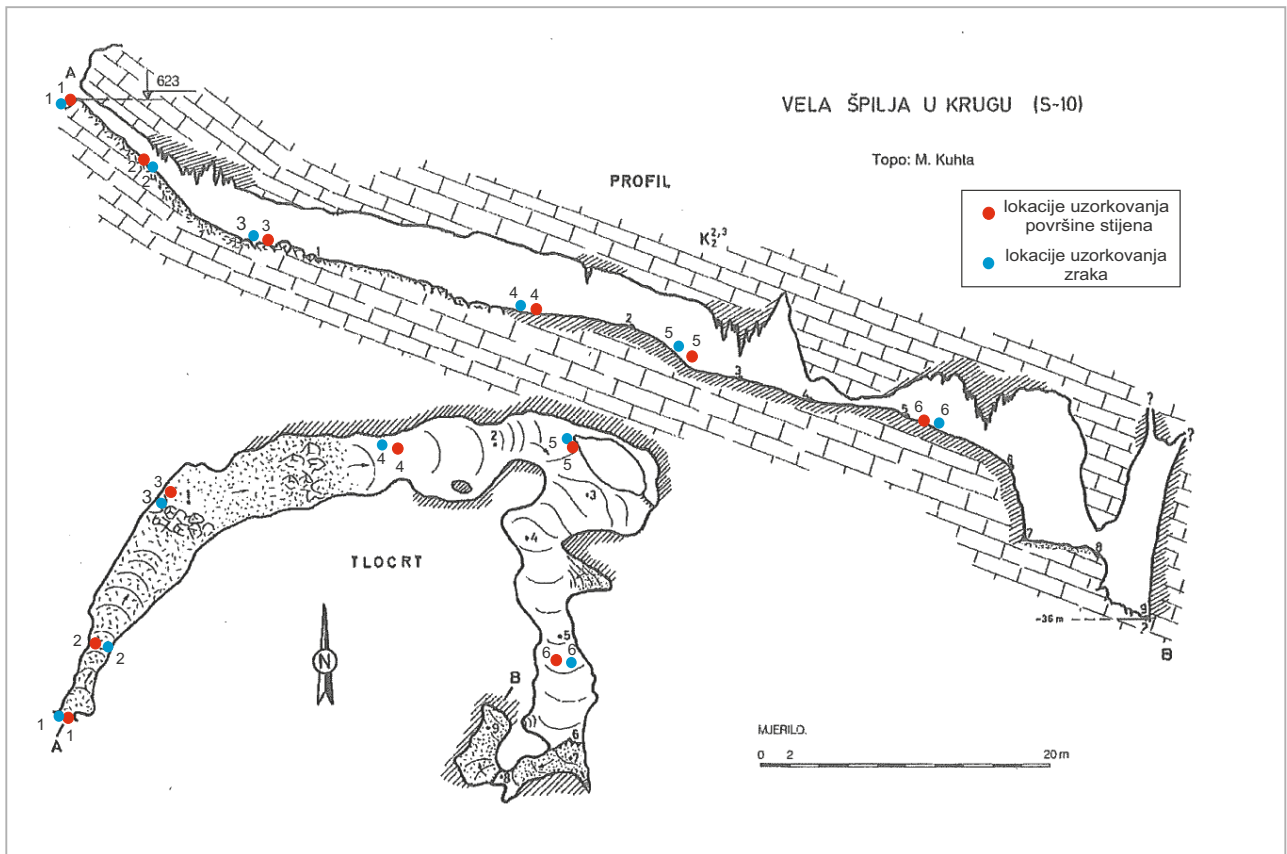
Topografski nacrt Bačve. | Topografski snimio: Andrea Deklić



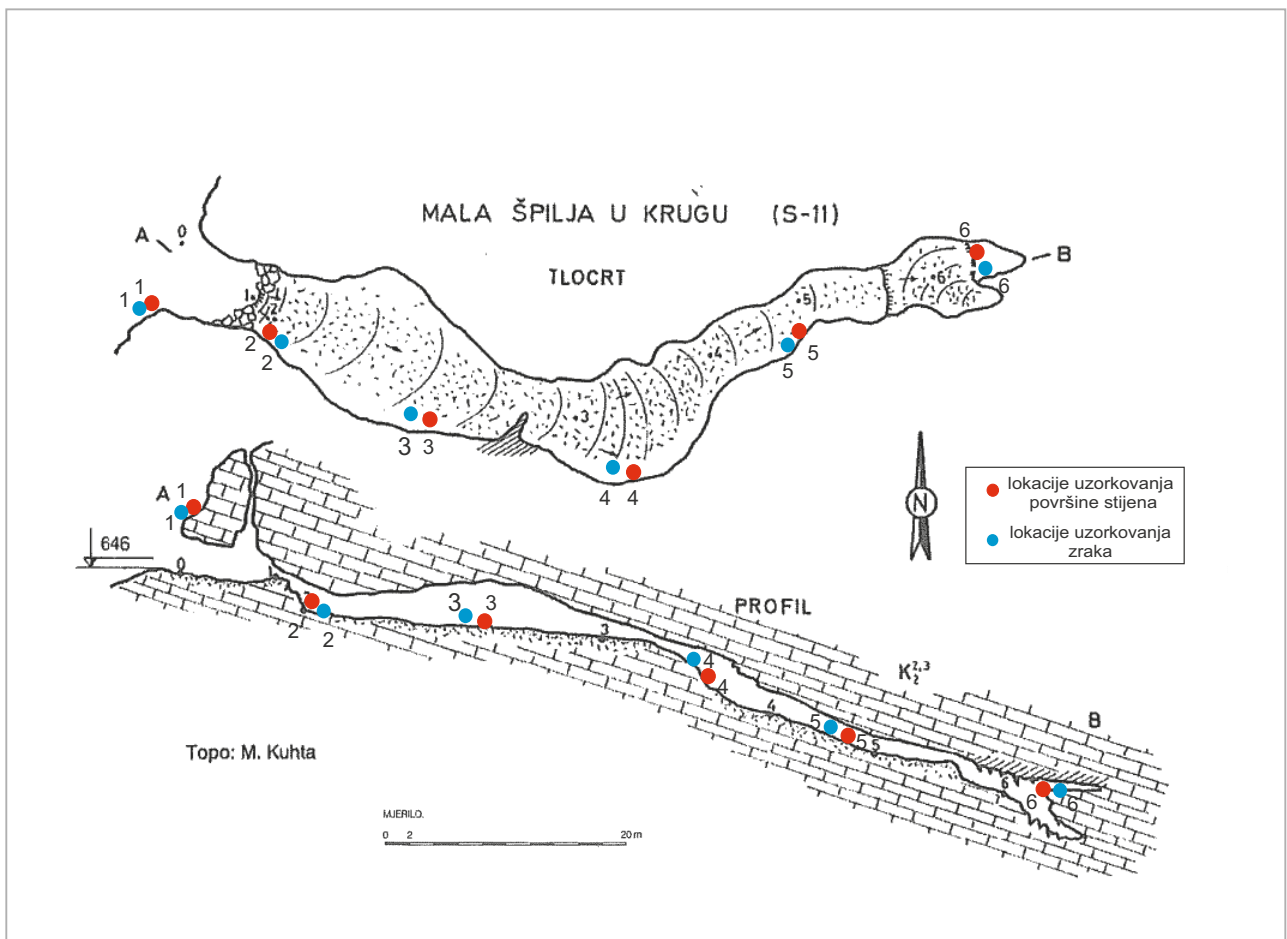
Topografski nacrt Vele peći. | Topografski snimila: Iva Marković (prvo istraživanje nacrt izradio: Ivan Glavaš)



Topografski nacrt Šparožne pećine. | Topografski snimili: Dalibor Reš, Martina Borovec, Tina Valenčić



Topografski nacrt Vele špilje u krugu. | Topografski snimio: Mladen Kuhta



Topografski nacrt Male špilje u krugu. | Topografski snimio: Mladen Kuhta

Metode

Određivanje ukupnog broja heterotrofnih aerobnih bakterija provedeno je na neselektivnim čvrstim hranjivim podlogama LB-Lennox (LB) (Zimbro i sur. 2009) i Nutrient Agar (NA) (Biolife). Ove hranjive podloge omogućuju rast velikom broju mikroorganizama koji nemaju zahtjevne nutritivne prohtjeve. Reasoner's 2A Agar (R2A) je oligotrofna hranjiva podloga, namijenjena uzgoju heterotrofnih, spororastućih mikroorganizama iz oskudnih staništa, koji bi bili nadraženi od bakterija koje brzo rastu (Reasoner, 1985). Ista hranjiva podloga korištena je za provjeru hipoteze o smanjenju broja fototrofnih mikroorganizama s dubinom u speleološkom objektu (vidi Obrada uzoraka). Dokazivanje prisutnosti koliformnih bakterija provedeno je na selektivno diferencijalnoj podlozi EC X-GLUC agar (Biolife). Koliformne bakterije su normalni simbionti debelog crijeva toplokrvnih životinja. U okoliš dospijevaju fecesom. Fekalni koliformi su dokazani na istoj podlozi pri temperaturi uzgoja od 44.5°C (Dekić & Hrenović, 2017).

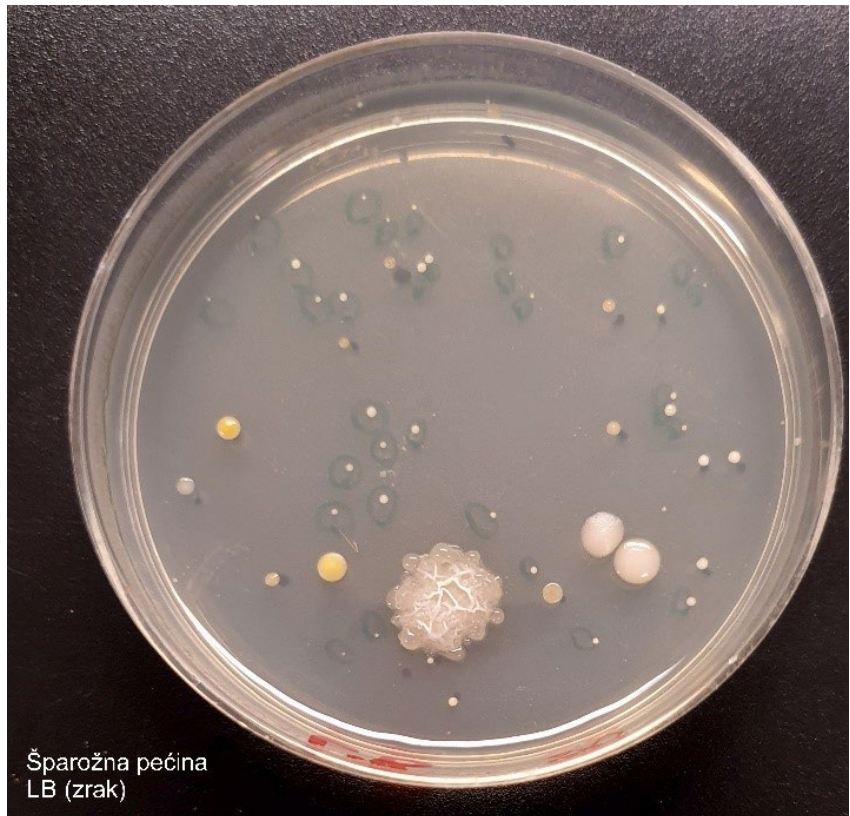
Korištene komercijalno dostupne podloge, kao i sastavnice "biološkog" podrijetla su proizvođača Biolife, soli VWR Chemicals, piruvat BDH Prolabo i škrob Gram Mol. Podloge su pripremljene prema standardnim metodama i sterilizirane autoklavanjem na 121°C, 2 atm, 20 minuta, nakon čega su izlivena u Petrijeve zdjelice (Zimbro i sur. 2009). Za razrjeđivanja korištena je sterilna 0.3% otopina natrijeva klorida. Inkubacija svih uzoraka vršena je u inkubatoru s aktivnom ventilacijom pri 30°C odnosno 44.5°C kroz 24 odnosno 48 sati.

Obrada uzoraka

Nacijepljene hranjive podloge su inkubirane u termostatu odmah po dolasku u laboratorij, dok su ostali uzorci inkubirani odmah nakon obrade. Ako nije drugačije navedeno, svi su uzorci inkubirani na 30°C kroz 24 ili 48 sati u mraku.



Slika 12. | Širenje razmaza uzorka na hranjive podloge u laboratoriju | Foto: Lucija Tomić



Šparožna pećina
LB (zrak)

Slika 13. | Kolonije bakterija na podlozi LB uzorka zraka iz Šparožne pećine | Foto: Petar Čuček

Brisevi su obrađeni kako slijedi:

1. Inokulacija netom uzetog brisa na hranjivu podlogu u speleološkom objektu metodom širenja razmaza po cijeloj površini, nakon čega su zatvorene samoljepivim filmom.
2. Inokulacija brisa na hranjivu podlogu u laboratoriju što je uključivalo potpune aseptičke mjere.
3. Suspendiranje sadržaja brisa u sterilnoj fiziološkoj otopini (1.5 mL) vorteksiranjem u najmanjem trajanju od 30 sekundi,

nakon čega je uslijedila inokulacija 0.05 mL suspenzije metodom širenja razmaza (Slika 12). Na ovaj način su nacijepljeni uzorci na R2A, LB, NA i EX-X-GLUC hranjive podloge u triplicatu. EC-X-GLUC je inkubirana na 44.5°C. Uzorci na R2A su inkubirani na 30°C - jedna serija uzoraka s LED rasvjetom u inkubatoru, a druga u standardnim (mrak) uvjetima.

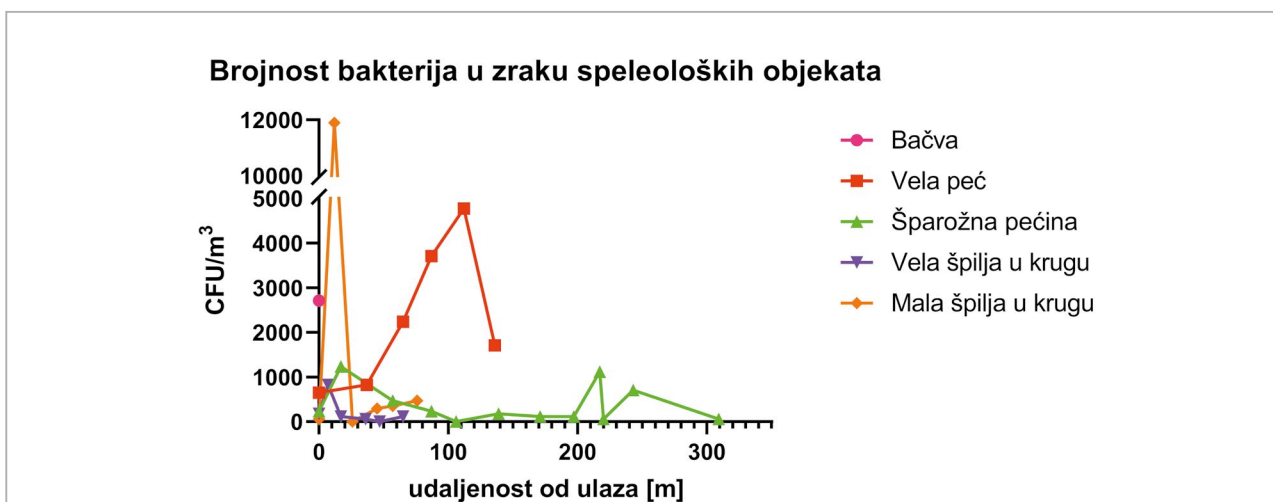
Po inkubaciji, vidljive kolonije bakterija su pobrojane i vrijednosti obrađene (Slika 13). Obrada se sastojala od računanja Colony Forming Units

(CFU), izrade grafičkih prikaza i usporedbe statističke značajnosti. Za briseve su brojevi bakterija izraženi kao CFU/25cm² a za zrak CFU/m³ (Pasquarella i sur. 2000. i Sitkowska, J. i sur. 2015). Za potrebe statističke obrade rezultatima je utvrđena distribucija Shapiro Wilkovim testom normalnosti, te su provedeni neparametrijski testovi, Kruskal-Wallis za procjenu značajnosti izbora hranjivih podloga i predtretmana uzroka, te Mann-Whitneyov U test i Wilcoxon test rangova zavisnih uzoraka za procjenu značajnosti razlike medija na CFU-a.

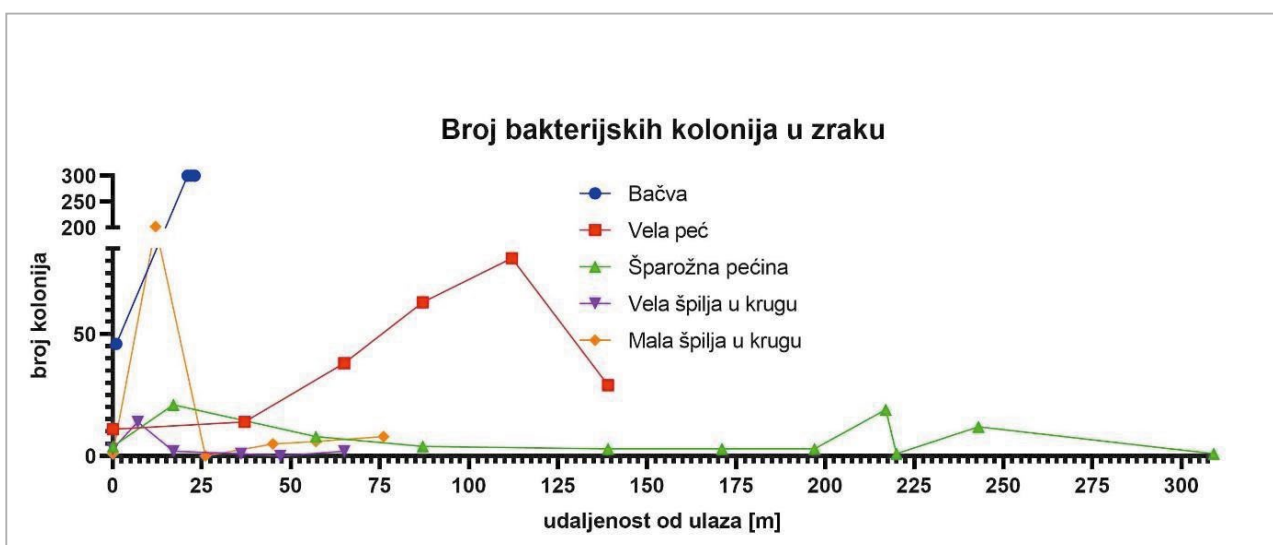
Rezultati

Brojnost bakterija u zraku

Uz poneka odstupanja koja se mogu objasniti prisutnošću šišmiša, kapašnjima vode, jačim strujanjima zraka, postoji generalni trend smanjena brojnosti bakterija u zraku istraživanih objekata s udaljenošću od ulaza. Zamijećen je porast broja bakterija u prvih par metara objekta, što bi se moglo pripisati povoljnim ekološkim uvjetima - smanjena količina UV zračenja, ali očuvan dotok tvari i protok životinja (Graf 1, 2).



Graf 1. | Brojnost bakterija u zraku po udaljenosti od ulaza speleoloških objekata



Graf 2. | Broj bakterijskih kolonija u zraku po udaljenosti od ulaza speleoloških objekata

Tablica 1. | Rezultati brojnosti bakterija u zraku po speleološkim objektima

Bačva	Brojnost bakterija u zraku većine uzoraka u ovom objektu je nebrojiva, petrijevke su ostavljene u objektu 24 sata i vidljivo su bile nagrižene od strane drugih organizama.
Vela peč	Zanimljive su točke 3, 4 i 5 uzorkovanja zraka koje su karakterizirali specifični uvjeti. Točka broj 3 se nalazi na mjestu snažne cirkulacije zraka na izloženoj točki, lokacija točke broj 4 je posebna jer je Petrijeva zdjelica postavljena u blizini kamenice u koju je kapala voda iz sige, a točka označena s brojem 5 se nalazi na izdvojenoj niši u kojoj je nađena veća količina guana i kostur šišmiša. Na ovim mjestima je zabilježen veći broj bakterija. Broj bakterija na lokaciji najudaljenijoj od ulaza je veći nego na ulaznim dijelovima, ali manje nego na točkama 4 i 5.
Šparožna pećina	Brojnost bakterija u zraku ispred ovog objekta je manja nego u ulaznom dijelu (točka 2) gdje još uvijek dopire sunčeva svjetlost te prevladavaju drugačiji uvjeti od onih u udaljenijih od ulaza. Brojnost bakterija u sljedećim točkama ne odstupa značajno, osim u točki 5, gdje nije detektirana niti jedna bakterija. Točka 9 ima nešto veći broj bakterija (1100 CFU/m ³) što je uzrokovano duljom ekspozicijom jer se prilikom postavljanja Petrijeve zdjelice nakon otvaranja zadržalo duže vrijeme u njenoj blizini.
Vela špilja u krugu	Brojnost bakterija u zraku ispred ulaza u ovaj objekt iznosi 177 CFU/m ³ , a u sljedećoj točki, užem ulaznom djelu, povećava se na 824 CFU/m ³ . U nastavku objekta zabilježen je trend pada količine bakterija, dok je na zadnjoj točki (prije vertikale) broj porastao sa 6 na 118 CFU/m ³ .
Mala špilja u krugu	Brojnost bakterija u zraku ispred ulaza iznosi 59 CFU/m ³ , dok je u uskom ulaznom kanalu povećan na 6000 CFU/m ³ . U točki na kojoj je primijećen guano i šišmiši u hibernaciji, zabilježeno je povećanje broja bakterija na 294 CFU/m ³ , nakon lokacije sa šišmišima, broj bakterija u zraku konstantno raste te doseže 471 CFU/m ³ na kraju objekta.

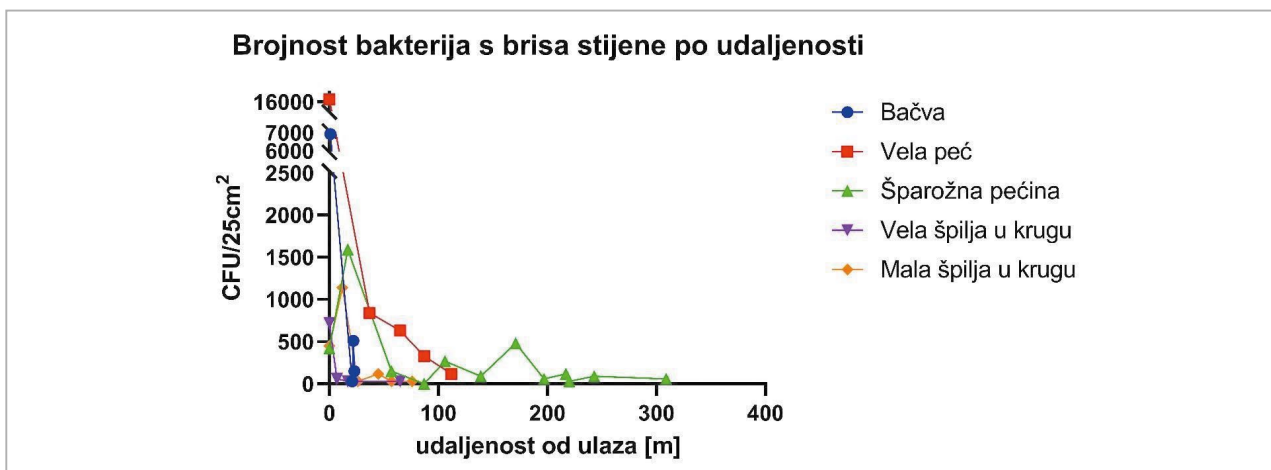
Brojnost bakterija na površini stijena

Uz poneka odstupanja koja se mogu objasniti prisutnošću šišmiša, otkanjanima vode ili antropogenim učinkom, postoji generalni trend smanjena brojnosti bakterija na površinama stijena istraživanih objekata s udaljenošću od ulaza (Graf 3, 4).

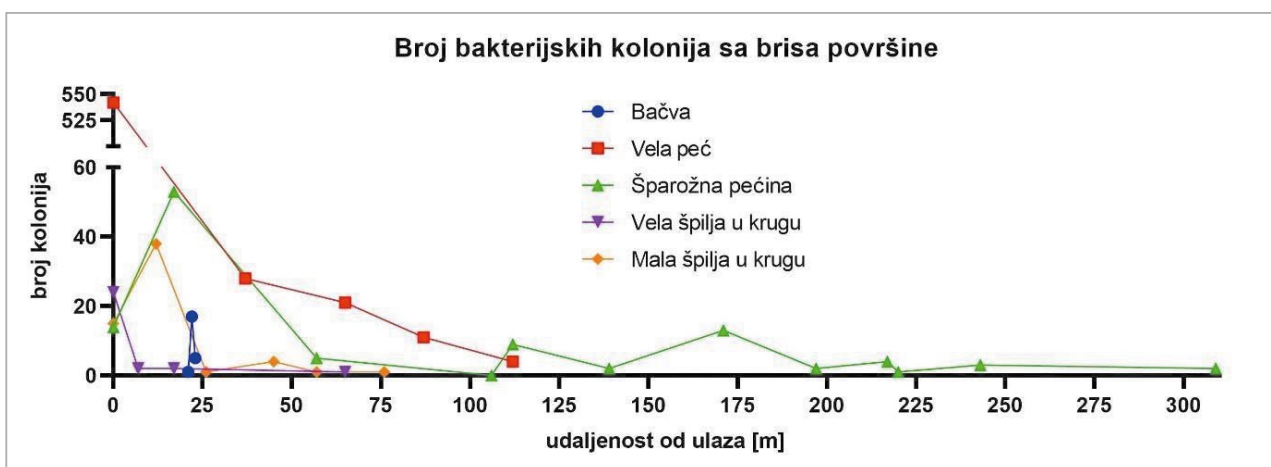
Broj heterotrofnih bakterija u zraku različitih speleoloških objekata (i lokacija ispred ulaza u objekt) uspoređene je Kruskal-Wallisovim testom te po potrebi Dunnovom multiplom usporedbom. Utvrđene su značajne razlike između ukupnog broja bakterija u zraku različitih speleoloških objekata ($H=10.47$, $p=0.015$), i to između Vele peći i Šparožne pećine ($p=0.040$) i Vele špilje u krugu ($p=0.017$). Kod broja bakterija uzorkovanih na površinama stijena nije pronađena statistički značajna razlika Kruskal-Wallisovim testom ($H=5.812$, $p=0.231$) između različitih objekata. Uzorci iz Šparožne peći su inokulirani na sve hranjive podloge,

te su obrađeni podaci u vezi s izborom hranjivih podloga za kultivaciju mikroorganizama. Usporedbom broja heterotrofnih bakterija iz uzoraka brisa površine na LB i NA podlogama Wilcoxonovim testom rangova zavisnih uzoraka (W), pokazano je kako nema značajne razlike ($W=10$, $p=0.1250$). Kako je broj poraslih kolonija malen, LB bi se mogla proglašiti boljom podlogom za enumeraciju ukupnih heterotrofa iz uzoraka uzetih brisom površina. Rezultati iste usporedbe na broju heterotrofnih bakterija iz zraka Wilcoxonovim testom rangova zavisnih uzoraka pokazano je kako pri inkubaciji od 24 h nema značajne razlike ($W=24$, $p=3105$), dok je pri inkubaciji od 48 h na LBU naraslo značajno više bakterija ($W=54$, $p=0.0137$). Uzevši u obzir relativno mali broj kolonija koji je porastao, preporučujemo 48-h inkubaciju. Usporedbom broja heterotrofnih bakterija iz uzoraka brisa površine, Wilcoxonovim testom rangova zavisnih uzoraka je pokazano kako se postiže veći CFU ako se bris prvo suspendira u fiziološkoj

otopini u odnosu na direktno naciepljivanje na hranjivu podlogu ($W=60$, $p=0.0024$). Na uzorku Mala i Velike špilje u krugu obrađeni su podaci o utjecaju pohrane briseva od uzorkovanja do naciepljivanja na hranjive podloge. Brisevi su: 1) odmah u objektu naciepljeni na hranjive podloge; 2) pohranjeni na $+4^{\circ}\text{C}$; 3) pohranjeni na -20°C . Kako se radi o malom broju uzorka po skupini, taj dio istraživanja bi trebalo ponoviti. Kruskal Wallis test nije pokazao statistički značajne razlike broja bakterija po jedinici površine s obzirom na način čuvanja brisa ili duljinu inkubacije. *Za očekivati je da će se s čuvanjem uzoraka u hladnjaku doći do promijene broja vijablinih stanica, a zamrzavanjem bi se trebalo očuvati broj stanica, u ovom slučaju dogodio se obrat, te je broj stanica inokuliran direktno u objektu nešto manji nego broj stanica koje su zamrzavane.* Korelacija udaljenosti od ulaza u objekt (uziman je u obzir i uzorak uzorkovan ispred ulaza u speleološki objekt) i broja heterotrofnih bakterija na uzorkovanim površinama



Graf 3. | Brojnost bakterija s brisa površine stijena po udaljenosti od ulaza speleoloških objekata



Graf 4. | Broj bakterijskih kolonija s brisa površine stijena po udaljenosti od ulaza speleoloških objekata

Tablica 2. | Rezultati brojnosti bakterija na površini stijena po speleološkim objektima

Bačva	Brojnost bakterija na uzorkovanoj plohi na ulazu u objekt je veća nego u samom objektu. Povećanje broja bakterija u objektu se primjećuje kod lokacija u manjim kanalima (3 i 4), a pogotovo na točki 3 gdje je zamijećen i guano.
Vela peč	Broj bakterija na površini/ulazu u objekt najveći je od svih uzorkovanih briseva ($1,6 \cdot 10^4$ CFU/25 cm ²), te pada s udaljenošću od ulaza (do 120 CFU/25 cm ²). U usporedbi s količinom bakterija iz zraka, nisu zamijećeni trendovi.
Šparožna pećina	Šparožna pećina je zanimljiva jer se zna da je posjećuju ljudi te se izabrala lokacija 7 u cilju provjere utjecaja posjetitelja. Broj bakterija na površini stijena ispred ulaza iznosi 420 CFU/25 cm ² , a na točki 2, ulaznom, osunčanom dijelu objekta brojnost bakterija na površini raste na 1590 CFU/25 cm ² (čemu je vjerojatno zbog veće vlage, zaštićenosti donekle, ali i dalje dotoku organske tvari). Broj bakterija na površinama stijena u sljedećih par točaka ne varira previše, osim u točki 4, gdje nisu zabilježene. U točki 7, koja je izabrana jer se nalazi na suženju i gdje se stijene dotiču posjetitelji broj bakterija iznosi 480 CFU/25 cm ² . U sljedećih par točaka se može zamijetiti pad broja bakterija.
Vela špilja u krugu	Broj bakterija na površini stijena, ispred ulaza u objekt iznosi 89 CFU/25 cm ² , na sljedeće dvije točke brojnost pada, te na posljednje dvije točke nije detektirano bakterija.
Mala špilja u krugu	Najveća brojnost bakterija zabilježena je u uskom kanalu ulaza te je iznosila 1140 CFU/25 cm ² , dok su na ostalim lokacijama u objektu vrijednosti manje od 120 CFU/25 cm ² .

Tablica 3. | Koeficijent korelacije (r) broja heterotrofa s uzorkovanih površina i udaljenosti od ulaza

Speleološki objekt	Spearmanov r	p
Bačva	-0.4000	0.375 (NS)
Vela peč	-1.0000	0.0083 (Sig)
Šparožna pećina	-0.5368	0.0374 (Sig)
Vela špilja u krugu	-0.9487	0.0833 (NS)
Mala špilja u krugu	-0.7590	0.0503 (Sig)

stijena ukazuje na smanjenje broja bakterija (Tablica 3).

Za Šparožnu pećinu: udaljenost od ulaza vs. oligotrofne (R2A) u mraku, CFU/25cm² je -0.5790 (p=0.0260); dok udaljenost od ulaza vs. oligotrofne (R2A) na svjetlu, nisu značajno povezane -0.4456 (p=0.0737), no vidljivo je kako je korelacija manja. Rezultati upućuju kako se broj mikroorganizama uzgojenih u mraku i uzgojenih na svjetlu (kontrolirano s brojem heterotrofa) ne razlikuju značajno (Kruskal-Wallis H=0.2386, p=0.887). Korelacija između broja oligotrofa uzgojenih na svjetlosti vs. u mraku je 0.604 (p=0.020), te je vrlo slična za skupine oligotrofa uzgojenih u mračnim uvjetima vs. heterotrofne bakterija. Međutim korelacija oligotrofa uzgojenih sa svjetlom i heterotrofa je visoka (r=0.928, p=0.00005), što nas upućuje na to da smo možda samo na R2A uzgojili frakciju ukupnih bakterija koja ne bi bila uzgojena na LB, jer bi bila nadraštana ili im ne pogoduje visoka razina nutrijenata.

Zaključak

Različiti uvjeti u špiljama poput različite morfologije, cirkulacije zraka, zastupljenosti vode, prisutnosti šišmiša te različit utjecaj čovjeka u pojedinim špiljama utječu na zastupljenost i brojnost bakterija u špilji. U objektima Šparožna pećina, Velika špilja u krugu i Mala špilja u krugu brojnost bakterija u uzorku zraka bila je veća na ulaznom dijelu nego

ispred speleološkog objekta što bi se moglo povezati sa značajnim utjecajem svjetlosti na ulaznim dijelovima, značajnijim donosom organskih tvari a ujedno većim postotkom vlažnosti zraka i boljom zaštićenošću prostora. U Veloj peći brojnost bakterija u uzorku zraka povećava se s dubinom zbog toga što su mjesta uzorkovanja bila na mjestu veće cirkulacije zraka, u blizini vode koja kapa u kamenicu ili neposredno pored guana i kostura šišmiša. Uzorci briseva stijena u istraživanim špiljama pokazali su da se udaljavanjem od ulaza smanjuje brojnost bakterija. Na mjestima s manjim izoliranim i užim kanalima unutar špilje veća je brojnost bakterija, isto kao i na mjestima neposredno blizu guana. Dokazano je da se, općenito, udaljavanjem od ulaza te smanjivanjem vanjskih utjecaja brojnost bakterija smanjuje, izuzevši mjesta uzorkovanja s posebnim uvjetima poput velike cirkulacije zraka, tragovi guana ili vanjski utjecaj posjetitelja.

Nastavak istraživanja bi se trebao odnositi na proširenja uzorkovanja na više speleoloških objekata s različitim obilježjima, uzrokovane u različitim godišnjim dobima i uzorkovanje više uzoraka u samim objektima. Jedna od zanimljivih usporedbi bi bilo i uzorkovanje vode iz kame-nica, siga ili sedimenta te usporedba brojnosti bakterija u ispitivanim uzorcima.

Literatura

- Polšak, A., Šikić, D., 1963: OGK SFRJ 1:100000, Tumač za list Rovinj L33-100, Savezni geološki zavod, Beograd.
- Šikić, D., Pleničar, M., 1967: OGK SFRJ 1:100000, Tumač za list Ilirska Bistrica L33-89, Institut za geološka istraživanja, Zagreb i Geološki zavod, Ljubljana.
- Šikić, D., Polšak, A., 1963: OGK SFRJ 1:100000, Tumač za list Labin L33-101, Institut za geološka istraživanja, Zagreb.
- Reš, D., 2010: Šparožna pećina, *Subterranea croatica* 12/2010, str.15-19.
- Pasquarella, C., Pitzurra, O., i Savino, A., 2000.: The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection*, 46(4), 241–256.
- Reasoner, D. J., Geldreich, E. E., Branch, M. T., Water, D., Environmental, M., i Agency, U. S. E. P., 1985: A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. 49(1), 1–7
- Dekić, S.; Hrenović, J.: 2017.: Bakteriološka analiza izvorske vode uz najpoznatija izletišta Parka prirode Medvednica. *Hrvatske Vode*, 25(99), 13–16.
- Kuhta, M., 2001.: Speleološki objekti na području navlačne strukture Rječine, *Speleolog* 46/47, 23 – 29.
- Candiroglu, B., & Dogruoz Gungor, N. 2017.: Cave Ecosystems: Microbiological View. *European Journal of Biology*, 76(1), 36–42.
- Zimbrow, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., & Johnson, J. A. 2009.: Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media. Citeseer. 281.
- Tomczyk-Żak, K., & Zielenkiewicz, U. (2016). Microbial Diversity in Caves. *Geomicrobiology Journal*, 33(1), 20–38.
- Vuk, Marija 2017.: Bioraznolikost i antibiotska rezistencija bakterijskih izolata Dinarskog krškog podzemlja. Rad za rektorovu nagradu, Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

- Pašič, L., Kovče, B., Sket, B., & Herzog-Velikonja, B. (2010). Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology*, 71(1), 50–60.
- Mulec, J., Oarga-Mulec, A., Tomazin, R., & Matos, T. (2015). Characterization and fluorescence of yellow biofilms in karst caves, southwest Slovenia. *International Journal of Speleology*, 44(2), 107–114.
- Sitkowska, J., Sitkowski, W., Sitkowski, Ł., Lutnicki, K., & Adamek, Ł. (2015). Seasonal microbiological quality of air in veterinary practices in Poland, 22(4), 614–624.
- Martin-Sanchez, P. M., Jurado, V., Porca, E., Bastian, F., Lacanette, D., Alabouvette, C., & Saiz-Jimenez, C. (2014). Airborne microorganisms in Lascaux Cave (France). *International Journal of Speleology*, 43(3), 295–303.
- Mulec, J., Oarga-Mulec, A., Šturm, S., Tomazin, R., & Matos, T. (2017). Spacio-temporal distribution and tourist impact on airborne bacteria in a cave (Škocjan Caves, Slovenia). *Diversity*, 9(3).

Microbiology of caves from the areas of Istria and Kvarner

The goal of this work was to conduct preliminary research in the enumeration of heterotrophic bacteria in the air and on surfaces of speleological objects using traditional, culture-based enumeration. Research sites, speleological objects are situated in Istria and Kvarner. Results are indicating a trend of decrease in a number of bacteria in the air and on surfaces, with some discrepancies which can be explained with bats, dripping water or airflow, or anthropogenic impact. The results will enable optimization of the methods of sample collection, selection of the cultivation media, and bacterial enumeration in speleological objects. This data will be used as a base for future microbiological monitoring of caves.