

Mikrobna raznolikost geotermalnih voda u Hrvatskoj

Mitrović, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:575415>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Maja Mitrović

MIKROBNA RAZNOLIKOST GEOTERMALNIH VODA U HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Maja Mitrović

MIKROBNA RAZNOLIKOST GEOTERMALNIH VODA U HRVATSKOJ

DOKTORSKI RAD

Mentori: dr. sc. Sandi Orlić, znan. sav.

dr. sc. Tonči Rezić, prof.

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Maja Mitrović

MICROBIAL DIVERSITY OF GEOTHERMAL WATERS IN CROATIA

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors: Ph.D. Sandi Orlić, Senior Researcher

Ph.D. Tonči Rezić, Full Professor

Zagreb, 2023

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način pridonijeli ostvarenju ove disertacije.

Posebne zahvale idu dr. sc. Jasminki Kontrec, dr. sc. Branki Njegić Džakula i dr. sc. Atidi Selmani na svim znanstvenim i životnim savjetima te na neopisivoj podršci.

Veliko hvala najboljoj ekipi s posla dr. sc. Nives Matijaković Mlinarić, dr. sc. Loreni Selak, Marti Razum, Andrei Čačković i Dominiku Gomanu za sva zajednička druženja, korisne savjete, podršku i smijeh.

Neopisivo hvala mojim najdražima Melani, Ivi, Magdaleni, Rebeki, Valentini, Žaklini, Mirni, Viktoriji i Miranu. Hvala Vam što ste bili uz mene tijekom cijelog ovog puta, pružajući razumijevanje, podršku i neprestano vjerovanje u mene i moje sposobnosti, posebno u trenucima kada ni sama nisam vjerovala u njih. Sasvim sigurna sam ja da bez vas ovo ne bi bilo moguće!

Najveće hvala mojoj majci Grozdani, ocu Nenadu i sestri Jeleni za ukazanu beskompromisnu podršku i dani oslonac tijekom svih godina školovanja. Hvala za svu ljubav, pomoć, slušanje i vjeru u mene.

Hvala i ostatku moje obitelji na strpljenju i razumijevanju: baki Milki, baki Savki, tetki Vesni, tetku Damiru, Korneliji, Tomi, Filipu, Ani i Šimi.

A posebno hvala mojim nećacima Donatu, Grguru, Gašparu i Franu. Sati igre i smijeha s vama su mi punili baterije i omogućili da ovo postignem!

Ovaj rad posvećujem mojoj obitelji i mom najboljem prijatelju Ivi.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 5. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za akademsku godinu 2022./2023. održanoj dana 21.02.2023. godine u Zagrebu, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na 10. redovitoj sjednici održanoj 18.07.2023. godine.

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za procese taloženja, Zavoda za kemiju materijala, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu; u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; na Odjelu za mikrobnu ekologiju, Sveučilišta u Beču, pod vodstvom dr. sc. Sandi Orlića, znanstvenog savjetnika i dr. sc. Tonči Rezića, redovitog profesora, u sklopu poslijediplomskog sveučilišnog (dokorskog) studija Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam (smjer: Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo), Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u okviru znanstveno istraživačkog projekta „Višefazni pristup za dešifriranje mikrobne ekologije i biotehnološkog potencijala geotermalnih izvora u Hrvatskoj” (PZS-2019-02-7373).

ŽIVOTOPIS MENTORA

Prvi mentor: dr. sc. Sandi Orlić, znanstveni savjetnik na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu

Dr. sc. Sandi Orlić rođen je u Puli 1976. godine. Diplomirao, magistrirao i doktorirao je na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, u Zavodu za mikrobiologiju. Na radno mjesto docenta bio je izabran 2007. godine. Potom je bio na dva poslijedoktorska usavršavanja na KU Leuven, Belgija te na Cavanilles Institutu za bioraznolikost i evolucijsku biologiju Sveučilišta u Valenciji, Španjolska. Od 2010. godine radi na Institutu Ruđer Bošković, prvo u Centru za Istraživanje mora te potom u Zavodu za kemiju materijala. Bio je na više znanstvenih usavršavanja na Max Planck Institutu za morsku mikrobiologiju te je i vanjski suradnik njihove doktorske škole. Sudjelovao je na više projekta i bio voditelj Uspostavnog projekta HrZZ te MZO. Trenutno vodi HrZZ projekt. Do sada je objavio 68 znanstvena rada i ima preko 2000 citata.

Drugi mentor: dr. sc. Tonči Rezić, redoviti profesor na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu

Prof. dr. sc. Tonči Rezić diplomirao je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije (FKIT), a znanstveni magistarski rad i doktorat obranio je na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu (PBF), Sveučilišta u Zagrebu. Na PBF-u, u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju, tehnologiju piva i slada zaposlen je 2000. godine kao asistent, potom od 2009. kao docent, od 2013. godine kao izvanredni profesor, a od 2018. godine kao redoviti profesor. Znanstveno se usavršavao na University of Natural Resources and Applied Life Sciences (BOKU) i Division of Food Biotechnology (FB) (Beč, Austrija). Sudjelovao je na jednom europskom i pet domaćih znanstveno-istraživačkih projekta te je bio voditelj na tri bilateralna projekta u sklopu znanstveno-tehničke suradnje Austrije i Hrvatske. Tijekom dosadašnjeg rada je kao autor i koautor objavio 49 znanstvenih i stručnih radova te je recenzent i član uređivačkih odbora više znanstvenih časopisa. Objavio je 3 poglavlja u znanstvenim knjigama.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 631.461.3:662.997:663.18(497.5)(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

MIKROBNA RAZNOLIKOST GEOTERMALNIH VODA U HRVATSKOJ

Maja Mitrović, mag. biol.

Rad je izrađen u Laboratoriju za procese taloženja, Zavod za kemiju materijala, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Mentori: dr. sc. Sandi Orlić, znanstveni savjetnik i dr. sc. Tonči Rezić, redoviti profesor

Kratki sažetak disertacije: Geotermalne vode u Hrvatskoj predstavljaju slabo istražene lokalitete koji se uglavnom koriste u balneološke svrhe. Mikrobiološki aspekti tih voda u kontekstu biotehnološkog potencijala nisu uopće istraženi. U prvoj i drugoj fazi istraživanja, analizirala se mikrobna zajednica prokariota i eukariota u 19 (prokarioti), odnosno 14 (eukarioti) različitih geotermalnih lokaliteta, sekvenciranjem 16S i 18S rRNA gena. Rezultati su pokazali značajnu raznolikost termofilnih prokariota pri čemu su najzastupljeniji bili predstavnici Proteobacteria, Campylobacteria i Crenarchaeota, a zajednica je često bila dominirana jednim rodом (*Hydrogenophilus*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurovum*, *Thiofaba*, *Nitrospira*, *Ca. Nitrosotenuis* ili *Ca. Nitrososphaera*). Sezonska varijabilnost nije uočena. U sastavu mikrobnih eukariota, tijekom jeseni 2020. godine, pronađeni su predstavnici različitih funkcionalnih skupina, od primarnih proizvođača do razlagača (*Tribonema*, *Navicula*, *Cymbella*, *Spirogyra*, *Chromulina*, Fungi i Sagenista). Statističke analize u obje faze istraživanja ukazale su na važnost abiotičkih čimbenika poput temperature, pH vrijednosti i nutrijenata u oblikovanju strukture mikrobnih zajednica. S obzirom na dobivene rezultate i dominaciju prokariotskih zajednica vezanih za cikluse dušika (AOA, NOB, comammox) i sumpora (SOB, SRB), mikroorganizmi geotermalnih voda u Hrvatskoj mogu proizvesti širok raspon enzima bakterija i arheja s potencijalom u procesima bioremedijacije. Rezultati proučavanja mikrobnih eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske ukazuju na ekološki značaj mikroalgi te osim bioremedijacije, na moguće korištenje u proizvodnji biogoriva. Treća faza istraživanja uključivala je uzgoj termofilnih prokariota uključenih u proces nitrifikacije. Najčešći rodovi vezani za ciklus dušika uzgojeni u kulturama bili su *Meiothermus*, *Nitrospira*, *Candidatus Nitrososphaera*, *Ca. Nitrosotenuis* te *Denitratisoma*. Uzgojene kulture korištene su u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada u šaržnim sustavima pri 25 °C, gdje su dodatno smanjile ukupno organsko opterećenje i doprinijele poboljšanju procesa bioremedijacije. Sistematizirano proučavanje sastava i raznolikosti mikrobnih zajednica ekstremnih staništa ključno je za buduća istraživanja njihovog metabolizma na geotermalnim lokalitetima s visokim potencijalom u biotehnologiji.

Broj stranica: 203

Broj slika: 52

Broj tablica: 20

Broj literaturnih navoda: 284

Broj priloga: 15

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: termofili, 16S i 18S rRNA, nitrifikacija, bioremedijacija, biotehnološki potencijal

Datum obrane: 10. studenog 2023.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr. sc. Blaženka Kos, redovita profesorica (predsjednica povjerenstva)
2. dr. sc. Antonio Starčević, redoviti profesor (član povjerenstva)
3. dr. sc. Jelena Godrijan, viša znanstvena suradnica (članica povjerenstva)
4. dr. sc. Jurica Žučko, izvanredni profesor (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23. i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb. i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Ph.D. thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate University Doctoral Study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 631.461.3:662.997:663.18(497.5)(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Biotechnology

MICROBIAL DIVERSITY OF GEOTHERMAL WATERS IN CROATIA

Maja Mitrović, MSc

Thesis performed at Laboratory for Precipitation Processes, Division of Materials Chemistry, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Supervisors: Ph.D. Sandi Orlić, Senior Researcher & Ph.D. Tonči Rezić, Full Professor

Short abstract: Croatian geothermal waters represent poorly explored locations primarily used for balneological purposes. The microbiological aspects of these waters in the context of biotechnological potential have not been studied. In the first and second research phases, the prokaryotic and eukaryotic microbial communities were analyzed in 19 (prokaryotes) and 14 (eukaryotes) different geothermal locations, by 16S and 18S rRNA sequencing. The results revealed significant diversity among thermophilic prokaryotes, with the most abundant representatives being Proteobacteria, Campylobacteria, and Crenarchaeota. The communities were often dominated by a single genus (*Hydrogenophilus*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurovum*, *Thiofaba*, *Nitrospira*, *Ca. Nitrosotenuis*, or *Ca. Nitrososphaera*). No seasonal variability was observed. Among the microbial eukaryotes in autumn 2020., representatives of various functional groups were found, including primary producers and decomposers (*Tribonema*, *Navicula*, *Cymbella*, *Spirogyra*, *Chromulina*, Fungi and Sagenista). Statistical analyses in both research phases indicated the importance of abiotic factors such as temperature, pH value, and nutrients in microbial community shaping. Based on the obtained results and the dominance of prokaryotic communities associated with nitrogen (AOA, NOB, comammox) and sulfur cycles (SOB, SRB), Croatian geothermal waters have the potential to produce a wide range of bacterial and archaeal enzymes that can be applied in bioremediation. The results regarding microbial eukaryotes in Croatian geothermal waters highlight the ecological significance of microalgae and their potential use in biogas production, and bioremediation. The third research phase involved the cultivation of thermophilic prokaryotes involved in the nitrification process. The cultures' most common genera associated with the nitrogen cycle were *Meiothermus*, *Nitrospira*, *Candidatus Nitrososphaera*, *Ca. Nitrosotenuis*, and *Denitratisoma*. Some cultures were used in the biological treatment of biowaste leachate in batch systems at 25 °C, where they additionally reduced the total organic load and contributed to the improvement of the bioremediation process. The comprehensive investigation of microbial community composition and diversity in extreme habitats is crucial for future research of their metabolic processes at geothermal sites, which exhibit significant potential for biotechnological applications.

Number of pages: 203

Number of figures: 52

Number of tables: 20

Number of references: 284

Number of supplements: 15

Original in: Croatian

Keywords: thermophiles, 16S i 18S rRNA, nitrification, bioremediation, biotechnological potential

Date of the thesis defense: November 10, 2023

Reviewers:

1. Blaženka Kos, Ph.D., Full Professor
2. Antonio Starčević, Ph.D., Full Professor
3. Jelena Godrijan, Ph.D., Senior Research Associate
4. Jurica Žučko, Ph.D., Associate Professor (substitute)

Thesis deposited in Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23., and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb., and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

Popis kratica (akronimi)

AI – Artificial intelligence (umjetna inteligencija)

AMO – Ammonia monooxygenase (amonij monooksigenaza)

Anammox – Anaerobic ammonium oxidation (anaerobna oksidacija amonija)

ANOVA – Analysis of variance (analiza varijance)

ANRA – Assimilatory nitrite reduction to ammonium (asimilacijska redukcija nitrita u amonijak)

AOA – Ammonia-oxidizing archaea (amonij-oksidirajuće arheje)

AOB – Ammonia-oxidizing bacteria (amonij-oksidirajuće bakterije)

AOM – Ammonia-oxidizing microbes (amonij-oksidirajući mikrobi)

ASV – Amplicon sequence variant (varijanta sekvence amplikona)

Comammox – Complete ammonia oxidizers/oxidation (potpuni oksidanti amonija/potpuna oksidacija amonija)

DAG – Directed acyclic graph (usmjereni neciklički/aciklički graf)

DGGE – Denaturing gradient gel electrophoresis (elektroforeza s denaturirajućim gradijentom u gelu)

DIC – Dissolved inorganic carbon (otopljeni anorganski ugljik)

DNA – Deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kiselina)

DNRA – Dissimilatory nitrite reduction to ammonium (disimlacijska redukcija nitrita u amonijak)

DOC – Dissolved organic carbon (otopljeni organski ugljik)

EC – Electrical conductivity (električna vodljivost)

eDNA – Environmental DNA (okolišna DNA)

FISH – Fluorescence *in situ* hybridization (fluorescentna *in situ* hibridizacija)

HAO – Hydroxylamine oxidoreductase (hidroksilamin oksidoreduktaza)

KPK – Chemical oxygen demand (kemijska potrošnja kisika)

mRNA – Messenger RNA (glasnička RNA)

NGS – Next generation sequencing (nova generacija sekvenciranja)

NOB – Nitrite-oxidizing bacteria (nitrit-oksidirajuće bakterije)

NXR – Nitrite oxidoreductase (nitrit oksidoreduktaza)

OG – Optical density (optička gustoća)

PBS – Phosphate-buffered saline (slana otopina s fosfatnim puferom)

PBS – Pannonian basin system (Panonski bazenski sustav)

PCA – Principal component analysis (analiza glavnih komponenata)

PCoA – Principal coordinate analysis (analiza glavnih koordinata)

PCR – Polymerase chain reaction (lančana reakcija polimerazom)

PERMANOVA – Permutational analysis of variance (permutacijska multivarijatna analiza varijance)

RNA – Ribonucleic acid (ribonukleinska kiselina)

rRNA – Ribosomal RNA (ribosomska RNA)

SOB – Sulfur-oxidizing bacteria (sumpor-oksidirajuće bakterije)

SRB – Sulfate-reducing bacteria (sulfat-reducirajuće bakterije)

TGGE – Temperature gradient gel electrophoresis (elektroforeza u gelu s temperaturnim gradijentom)

TN – Total nitrogen (ukupni dušik)

T-RFLP – Terminal restriction fragment length polymorphism (polimorfizam duljine krajnjih restrikcijskih fragmenata)

TSS – Total suspended solids (ukupna suspendirana tvar)

qPCR – Quantitative polymerase chain reaction (lančana reakcija polimerazom u realnom vremenu, kvantitativna lančana reakcija polimerazom)

SAŽETAK

Republika Hrvatska ima brojne neistražene geotermalne lokalitete s različitim hidrokemijskim i hidrogeološkim karakteristikama, koji se uglavnom koriste u balneološke svrhe, a čiji mikrobiološki aspekti u kontekstu biotehnološkog potencijala nisu istraženi. Glavni fokus ove disertacije bio je istražiti strukturu prokariotskih i eukariotskih mikrobnih zajednica na 19 različitih geotermalnih lokaliteta u Hrvatskoj sekvenciranjem 16S i 18S rRNA dijelova gena. Otkriće da geotermalne vode Hrvatske sadržavaju filogenetski raznolike mikroorganizme prilagođene ekstremnim uvjetima temperature unutar domena Archaea, Bacteria i Eukaryota, pruža važne uvide u mikrobnu raznolikost i njihov mogući potencijal za različite biotehnološke procese. Istraživanje je otkrilo da je prokariotska zajednica bila stabilna tijekom tri sezone uzorkovanja te vrlo specifična za mjesto uzorkovanja, dok je proučavanje mikrobnih eukariota tijekom jeseni 2020. godine ukazalo na prisutnost mikrobnih predstavnika s različitim funkcionalnim ulogama, posebice primarnih proizvođača. Temperatura i pH vrijednost u kombinaciji s nutrijentima su bili glavni abiotički čimbenici koji su značajno utjecali na sastav mikrobne zajednice, posebno na dihotomiju prokariota na različitim lokalitetima. Rezultati kultivacije nitrificirajućih mikroorganizama u prilagođenim hranjivim podlogama s dodatkom supstrata određenih koncentracija te u aseptičnim uvjetima, ukazali su na spor i djelomično uspješan uzgoj ciljanih mikroorganizama. Uzgojene kulture korištene su u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada u šaržnim sustavima pri 25 °C, gdje su doprinijele smanjenju ukupnog organskog opterećenja za 90 %, odnosno 92 % u odnosu na kontrolu (88 %) te time i poboljšanju procesa bioremedijacije. Znanstveni doprinosi ove disertacije temelje se na *in situ* praćenju prilagodba mikrobnih zajednica na različite abiotičke čimbenike u geotermalnim vodama u Hrvatskoj pomoću metabarkodiranja eDNA, primjene različitih statističkih analiza i matematičkih modela uzročnosti te laboratorijskih metoda uzgoja. Ova disertacija predstavlja prvi uvid u sastav prokariotskih i eukariotskih mikrobnih zajednica geotermalnih voda u Hrvatskoj te nudi nove spoznaje o uzgoju prokariotskih ekstremofila i procesima bioremedijacije. Dobiveni rezultati otvaraju mogućnosti za potencijalnu biotehnološku primjenu pronađenih termofila u različitim procesima, posebice u procesima bioremedijacije (AOA, AOB, NOB, comammox, SOB, SRB, mikroalge), ali i za proizvodnju biogoriva (mikroalge) te njihovu ulogu kao bioloških indikatora (mikroalge), što se sada može detaljnije proučavati.

EXTENDED ABSTRACT

Croatia harbors numerous geothermal sites with different hydrochemical and hydrogeological characteristics, which create unique ecological habitats for diverse microbial communities. The influence of water characteristics, especially temperature, shapes the microbial community structure. Previous research indicates that the biological diversity and abundance of microorganisms are reduced in geothermal waters compared to other aquatic habitats (Moeck, 2014; Valeriani et al., 2018). The composition of microbial communities in geothermal waters is greatly influenced by various physicochemical parameters such as temperature, pH, dissolved oxygen concentration, and nutrient availability (Huang et al., 2021; Lagostina et al., 2021), although this is not always the case (Kormas et al., 2009). Biological interactions among microorganisms strongly affect the properties of microbial communities, such as the growth of individual species and the overall community composition (Schink, 2002; Nadell et al., 2016). In addition to physicochemical and biological interactions, hydrogeological and geological properties, including biogeography, also have a significant impact on the structure of microbial communities (Huang et al., 2011; Inskeep et al., 2013). The different combinations of hydrogeological, geological, and biogeographic characteristics of geothermal waters lead to their classification into various types of aquifers.

For a long time, it was believed that the majority of investigated extremophiles belonged to the Archaea domain (Eme and Doolittle, 2015). However, over the past decade, many microbial species adapted to life and proliferation in extreme conditions have been discovered, belonging to the Bacteria and Eukaryota domains (van den Burg, 2003). It has been found that microbial communities in geothermal waters are composed of phylogenetically diverse microorganisms adapted to different extreme environmental conditions, such as temperature (thermophiles), salinity (halophiles), pressure (piezophiles), and pH (acidophiles and alkalophiles) (Adiguzel et al., 2009). Thanks to their adaptability and growth in extreme conditions, numerous studies have been conducted to uncover their physiological properties.

Among the diverse types of extremophiles, special attention has been given to thermophiles, primarily due to their significant biotechnological potential (van den Burg, 2003; Adiguzel et al., 2009). Studies have shown that the availability of nitrogen and sulfur compounds, as major nutrients, and their mutual ratios play a crucial role in shaping the structure of microbial communities (Yazdi et al., 2014; Huang et al., 2021; Lagostina et al., 2021). Geothermal waters, with their dichotomy of microorganisms involved in the oxidation and reduction of nitrogen and sulfur compounds, represent an extremely diverse habitat for

numerous bacteria and archaea with corresponding enzymes. Enzymes characteristic of reactions such as nitrification and denitrification, key components of bioremediation processes, as well as other potential biotechnological applications, are particularly noteworthy (van den Burg, 2003; Jorquera et al., 2019; Maddela et al., 2022).

Investigating the diversity of prokaryotic and eukaryotic microorganisms, but especially their functional characteristics, often presents a challenge. Different techniques for the identification and quantification of target microorganisms have been developed, such as ribosomal RNA (rRNA) analysis. This identification approach is applied to the 16S rRNA gene, which is the most commonly used phylogenetic marker for identifying the composition of prokaryotic microbial communities. Furthermore, the analysis of the 18S rRNA gene enables the identification of eukaryotic microorganisms (Kirchman, 2008; Su et al., 2012). The development of next-generation sequencing (NGS) methods has allowed for a more detailed understanding of microbial diversity (Tan et al., 2015; Lojo-Kadrić et al., 2018), especially regarding prokaryotic diversity, where databases are constantly being filled with new sequences and corresponding taxonomy, unlike the generally less explored eukaryotic diversity. On the other hand, although cultivation-based methods have been insufficient to obtain results on the structure and diversity of microbial communities in diverse habitats, detailed exploration of the archaeal and bacterial physiology typically requires the cultivation methods. Investigating individual species in pure cultures under laboratory conditions contributes to the determination of their potential functional characteristics. This is often extremely difficult to achieve because the majority of prokaryotes (99 %) cannot be cultivated in the laboratory, thus only a small number of known prokaryotic lineages have cultured representatives (Su et al., 2012). While advanced techniques like metagenomics, metatranscriptomics, and metaproteomics, provide a more precise insight into microbial functional potential and deliver quicker results than traditional cultivation methods, many studies in microbial ecology still frequently rely on the diversity analysis of the 16S and 18S rRNA genes with derived assumptions about their functional capabilities (Karst et al., 2016; Lojo-Kadrić, 2018).

Furthermore, significant progress has been observed in the field of artificial intelligence (AI) and causal analysis. This progress stems from the development of numerous new algorithms and their application in exploring new and improving existing processes to achieve a deeper understanding of complex systems and analyze large datasets (Solvang i Subbey, 2019; Kurtanjek, 2021). For instance, one approach to assessing the influence of physicochemical parameters on microbial diversity in investigated ecosystems can be based on causal mathematical models. This approach brings numerous advantages, including reducing

experimental effort and simplifying the selection of specific microorganism cultivation conditions with significant biotechnological potential, such as applications in bioremediation processes or the degradation of bio-waste (Rezić et al., 2021; Diemer i sur., 2021; Arif i MacNeil, 2022).

Geologically, the territory of Croatia is divided into two segments: the Pannonian region in the north/northeast and the Dinaric region in the south/southwest. The northern part of Croatia represents the southwestern edge of the Pannonian Basin System (PBS), and the exact boundary between these two areas is the southern border of the Sava Depression. The Pannonian region of Croatia is characterized by an extremely high average geothermal gradient (49 °C/km) and surface heat flow (76 mW/m²) (Bošnjak et al., 1998). These favorable geothermal conditions in the area result from the presence of a shallow Moho discontinuity, which is the boundary between the Earth's crust and mantle and is located at a depth of 25 to 28 km (Aljinović and Blašković, 1984; Šumanovac et al., 2009; Šumanovac et al., 2016). Thanks to these favorable geological conditions, geothermal sites are common in this area, and many of them serve as balneological destinations, i.e., rehabilitation and recreational centers, such as thermal spa Varaždin, Krapina, Stubica, Daruvar, and others. On the other hand, the southern/southwestern part of Croatia (Dinaric region) does not have favorable conditions for the geothermal waters' occurrence. In this area, the Mohorovičić seismic discontinuity is deeper, located at a depth of about 50 km below the surface, resulting in a lower average geothermal gradient (18 °C/km) and surface heat flow (29 mW/m²) (Bošnjak et al., 1998). However, some low-temperature geothermal sites (<30 °C) have developed in this region, with the most well-known spring being thermal spa Istra.

Although the commercial utilization of geothermal waters is already underway in Croatia, their biotechnological potential remains largely unexplored. Unfortunately, the ecology of microorganisms in this specific environment has not been sufficiently studied, and to our knowledge, no research has been conducted on the microbial diversity of Croatian geothermal waters to date. Therefore, it is crucial for future research to gain a more detailed understanding of the microbial biodiversity inhabiting this extreme environment, which represents an essential first step in comprehending the metabolism of dominant microorganisms in geothermal sites with exceptional biotechnological potential, as well as establishing connections between the structure of the microbial community and the physicochemical properties of geothermal waters. In this particular study, 19 geothermal sites, predominantly located in central and eastern Croatia, were selected to conduct a basic characterization of prokaryotic and eukaryotic microbial communities, and to determine the seasonal

hydrochemical composition in order to gather information about their potential biotechnological capacity.

The main objective of this dissertation was to characterize the microbial communities, both prokaryotic and eukaryotic, present in most significant geothermal sites in Croatia. The study aimed to investigate spatial and temporal variations of these communities, as well as to determine the abiotic factors influencing microbial community structure. Additionally, the focus was on identifying and studying the microbial communities involved in the nitrification process, specifically those utilizing nitrogen compounds as substrates for growth. The ultimate goal of the dissertation was to identify geothermal locations in Croatia with substantial biotechnological potential and highlight microorganisms demonstrating significant prospects for biotechnological applications in bioremediation processes and decomposition of bio-waste leachate. Consequently, three primary research hypotheses were formulated: (1) Temperature and pH values serve as the primary abiotic factors shaping prokaryotic and eukaryotic microbial communities in Croatian geothermal waters; (2) The availability of nutrients, such as nitrogen and sulfur compounds, significantly influences the composition of prokaryotic communities within each geothermal locality; (3) Minimal spatial and temporal differences exist in the microbial communities inhabiting Croatian geothermal waters due to the stable geothermal characteristics of the investigated aquifers.

This dissertation focuses on the investigation of numerous geothermal waters in Croatia, specifically 13 wells and 6 springs. These sites represent a relatively unexplored microbial habitat with significant untapped diversity potential. Understanding the composition of microbial communities in these extreme environments is crucial for future research endeavors. This study serves as an initial step towards establishing connections between microbial community structure and the physicochemical characteristics of geothermal waters. Additionally, it provides valuable insights into prevailing microbial metabolisms at these geothermal sites, which hold significant biotechnological potential. The research was conducted in three distinct phases, with the first phase already published as an independent scientific paper (Mitrović et al., 2022).

The first research phase involved monitoring 19 different geothermal localities mainly located in central and eastern Croatia during three sampling campaigns in autumn 2019, spring 2020, and autumn 2020. As part of the study, samples were collected directly from the location where water emerged from underground to facilitate microbial community analysis and chemical characterization. Prior to sampling, some physio-chemical parameters were measured *in situ* using a WTW multiparameter probe (WTW, Germany), while others were performed in

a laboratory within 24 h after collection. By employing 16S rRNA gene amplicon sequencing along with various statistical analyses, the study revealed that the predominant bacterial communities in the majority of geothermal waters were affiliated with Proteobacteria and Campylobacteria, while the majority of archaeal sequences were associated with Crenarchaeota. At the genus level, the prokaryotic community was highly site-specific and was often dominated by a single genus, including sites dominated by *Hydrogenophilus*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurovum*, *Thiofaba*, or *Nitrospira*, while the most abundant archaeal genera were affiliated to the ammonia-oxidizing archaea (AOA), *Candidatus Nitrosotenuis* and *Candidatus Nitrososphaera*. Whereas the microbial communities were overall highly location-specific, temperature, pH, ammonia, nitrate, total nitrogen, sulfate, hydrogen sulfide, dissolved organic, and inorganic carbon, were the abiotic factors that significantly affected microbial community composition. The community structure was mainly stable during the three sampled seasons. Examining geothermal waters revealed a dichotomy between communities, dominated by microorganisms involved in nitrogen- and sulfur-compound oxidation and reduction processes. These communities could exhibit genes associated with nitrogen and sulfur metabolism, suggesting the potential encoding of thermostable enzymes crucial for various reactions. It is plausible that Croatian geothermal springs may harbor a diverse array of bacterial and archaeal enzymes with potential applications in industrial processes, including bioremediation. A causal mathematical model not only affirmed two hypotheses regarding the significance of temperature, pH, and nutrient parameters for prokaryotes in Croatia's geothermal waters but also revealed potential interactions within the microbial community. In addition to yielding valuable insights into microbial community structure and abiotic factors, after the first sampling season, these obtained results served as the foundation for the study conducted during research phase three.

During the second research phase, the focus was on the identification of the eukaryotic microbial community. It should be emphasized that studying microbial eukaryotes in the geothermal waters of Croatia for only one season (autumn 2020) underestimates their functional diversity and significance in this extreme habitat type, due to the insufficient amount of data that would lead to more accurate conclusions. The current results serve as the basis for further investigation of seasonal community changes and the potential environmental factors driving these changes in the overall microbial eukaryotic community structure. After analyzing the water samples described in the first research phase, 18S rRNA gene amplicon sequencing revealed a typical eukaryotic structure similar to geothermal sites worldwide. The community consisted of various representatives including primary producers/mixotrophs (representatives

of Chlorophyta, Ochrophyta (*Tribonema*, *Navicula*, *Cymbella*, *Chromulina*), Streptophyta (*Spirogyra*), Cryptophyta (Cryptomonas), Dinoflagellata, decomposers (representatives of Fungi and Sagenista), mixotrophs/heterotrophs (representatives of Ciliophora, Pseudofungi, and commensals like Lobosa and Conosa), and parasites (representatives of Apicomplexa and Mesomycetozoa). It became evident that microbial eukaryotes, alongside prokaryotes, are intertwined in a network of interactions. PERMANOVA indicated that temperature together with pH value and nitrates were the leading parameters influencing eukaryotic community structure ($p < 0,05$) at 5 localities (JEZ, STU, TOP, SVM, and D1D) which exhibited the highest quantitative and qualitative microbial composition among the 14 investigated geothermal sites. Temperature predominantly exerted a negative impact on primary producers and decomposers, while pH value exhibited both positive and negative effects on primary producers, with a positive influence on Fungi. Nitrates influenced positively and negatively the representatives of primary producers. The microbial community displayed specificity to the sampling site and did not depend on the aquifer type or the geothermal site type (well or spring). These results highlighted the ecological importance of microalgae and their potential biotechnological applications, such as water bioremediation and biofuel/biodiesel production.

The third research phase conducted methods suitable for the cultivation of prokaryotic extremophilic microorganisms that participate in the nitrification process including ammonia-oxidizing archaea and bacteria (AOA, AOB), nitrite-oxidizing bacteria (NOB), and complete ammonia oxidizers (comammox organisms) due to possible biotechnological applications. The cultivation process was carried out in completely aseptic conditions at optimal temperature (46 °C) and pH values (6.0 – 8.0) with selective nutrient media of different compositions (low CaCO₃ AOM medium, NOB medium w/o NH₄Cl, OHIO medium, and hot springs original water). Optimal conditions for microbial growth were specified in the first research phase through seasonal sampling. Mixed culture samples were maintained and diluted after the determined sufficient substrate conversion (1 mM NaNO₂ or 1 mM NH₄Cl), in order to sustain active biomass and selectively enrich microorganisms of interest. During two years of cultivation, 16S rRNA gene amplicon sequencing revealed the prevalence of mesophilic to thermotolerant organisms, and occasionally hyperthermophiles, within the microbial communities. However, some cultures did show considerable concentrations of the desired representatives, such as the genera *Meiothermus* and *Nitrospira* (NOB, comammox), occasionally *Candidatus Nitrososphaera*, *Ca. Nitrosotenuis* (AOA) and *Denitratisoma*. These findings were confirmed by qPCR analysis targeting genes associated with the nitrogen cycle such as *amoA*, *nxA*, *nxB*. The results indicate a slow but partially successful selection of the

target microorganisms during this long-term cultivation experiment, which is not surprising considering the complexity and time-consuming nature of the cultivation process. The microbial community analysis in geothermal water cultures has revealed specific preferences of microorganisms related to the nitrogen cycle, depending on the diverse media and substrates (AOA – original water/OHIO medium + substrate with an initial concentration of 10 mM NH₄Cl, AOB – AOM medium + 25 mM NH₄Cl, NOB – NOB medium + 29 mM NaNO₂, comammox – OHIO medium + 10 mM NH₄Cl). Furthermore, in the biological treatment of biowaste leachate at a temperature of 25°C ± 2°C, when comparing the control group (Experiment 1) with Experiments 2 and 3 with added exogenous cultures (KRE, AVD), it was observed that the total organic load was reduced by 88 % in the control group, and by 90 %, i.e. 92 % in Experiments 2 and 3. Although this suggests that the natural degradation process of leachate predominated and that bioaugmentation had limited effectiveness in improving the overall process efficiency, it certainly contributed to the improvement of the bioremediation process. This limitation can be attributed to the lack of optimal conditions for the growth of thermophiles, such as temperature, which emphasizes the importance of biostimulation. Given that experiments were conducted in batch systems at lower temperatures, which are optimal for biotechnological processes due to economic considerations, it favored the proliferation of mesophilic microorganisms (*Leuconostoc*, *Weissella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pichia*, *Hanseniastpora*), as observed in the provided results. Moreover, the focus on isolating specific microorganisms in cultivation caused a reduction in biodiversity within the experimental setups, and along with temperature, influenced the results of biological treatment of biowaste leachate, in weaker outcomes than initially anticipated.

The scientific contributions of this dissertation are based on *in situ* monitoring of microbial communities' adaptive responses to different abiotic factors using environmental DNA metabarcoding, application of various statistical analyses and mathematical causality models, as well as laboratory cultivation methods. Overall, this dissertation represents the first cultivation-independent overview of the prokaryotic and eukaryotic microbial communities inhabiting Croatia's most relevant geothermal waters and provides novel insights into the cultivation methods for prokaryotic extremophiles in Croatia. Complete results are opening up possibilities for potential prokaryotic and eukaryotic biotechnological application in bioremediation processes (AOA, AOB, NOB, comammox, SOB, SRB, microalgae), in biofuel production, and as biological indicators (microalgae), which can now be further investigated in detail. Thus, the research objectives have been successfully achieved, and the obtained results in this dissertation confirmed the proposed research hypotheses.

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 6 |
| 2.1. Geotermalne vode Republike Hrvatske..... | 7 |
| 2.2. Raznolikost i važnost mikrobnih zajednica u geotermalnim vodama svijeta..... | 11 |
| 2.2.1. Prokarioti | 12 |
| 2.2.2. Eukarioti..... | 13 |
| 2.3. Biogeokemijski ciklus dušika..... | 14 |
| 2.3.1. Nitrifikacija..... | 15 |
| 2.3.2. Denitrifikacija | 18 |
| 2.4. Pregled metoda primjenjivih u istraživanjima mikrobne ekologije | 18 |
| 2.4.1. Molekularne metode | 19 |
| 2.4.1.1. Izolacija i kvantifikacija okolišne DNA..... | 19 |
| 2.4.1.2. Metoda nove generacije sekvenciranja - Sekvenciranje amplikona | 20 |
| 2.4.2. Metode temeljene na uzgoju | 22 |
| 2.4.3. Matematički modeli uzročnosti | 25 |
| 2.4.3.1. Primjena modela uzročnosti u mikrobnoj ekologiji..... | 26 |
| 2.5. Biotehnoška primjena termofila | 27 |
| 2.5.1. Obrada otpadnih voda..... | 27 |
| 2.5.1.1. Sekundarna obrada otpadnih voda - bioremedijacija..... | 28 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 31 |
| 3.1. Područje istraživanja i uzorkovanje | 32 |
| 3.2. Mjerenje i određivanje abiotičkih parametara | 34 |
| 3.3. Izolacija DNA, umnažanje PCR-om, sekvenciranje amplikona i bioinformatička obrada podataka..... | 35 |
| 3.4. PCR u realnom vremenu (qPCR, engl. quantitative/real-time PCR) | 37 |
| 3.5. Statistička obrada podataka | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6. Matematički modeli uzročnosti | 42 |
| 3.7. Metode uzgoja termofilnih nitrificirajućih prokariota..... | 43 |
| 3.7.1. Priprema medija za uzgoj | 44 |
| 3.7.2. Priprema supstrata za uzgoj | 46 |
| 3.7.3. Postupak inicijalnog uzgoja (engl. enrichment procedure) | 47 |
| 3.7.4. Održavanje i praćenje rasta kultura | 47 |
| 3.7.4.1. Brza laboratorijska evaluacija konverzije spojeva..... | 51 |
| 3.7.4.2. Kolorimetrijska determinacija amonija, nitrita i nitrata u kulturama..... | 51 |
| 3.8. Biološka obrada procjedne vode biootpada..... | 52 |
| 3.8.1. Postavljanje eksperimenta..... | 52 |
| 3.8.2. Praćenje razvoja mikrobnih zajednica i razgradnje procjedne vode biootpada | 55 |
| 4. REZULTATI..... | 58 |
| 4.1. Prva faza istraživanja | 59 |
| 4.1.1. Karakteristike fizikalno-kemijskih parametara..... | 59 |
| 4.1.2. Sastav i raznolikost prokariotske mikrobne zajednice u geotermalnim vodama Hrvatske | 63 |
| 4.1.3. Utjecaj mjesta i sezone uzorkovanja, vrste vodonosnika te fizikalno-kemijskih parametara na sve istraživane geotermalne vode u Hrvatskoj | 68 |
| 4.1.4. Oblikovanje mikrobne zajednice prokariota prema fizikalno-kemijskim parametrima unutar različitih skupina vodonosnika | 70 |
| 4.1.5. Moguće metaboličke funkcije identificiranih prokariota..... | 75 |
| 4.1.6. Matematički modeli uzročnosti | 77 |
| 4.2. Druga faza istraživanja..... | 80 |
| 4.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva vode..... | 80 |
| 4.2.2. Sastav i raznolikost zajednice eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske..... | 82 |
| 4.2.3. Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na sastav zajednice mikrobnih eukariota | 89 |
| 4.3. Treća faza istraživanja..... | 91 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.1. Uzgoj kultura | 91 |
| 4.3.1.1. Fizikalno-kemijski parametri vode korištene za inokulaciju i uzgoj prokariotske mikrobne zajednice | 91 |
| 4.3.1.2. Struktura uzgojene mikrobne zajednice prokariota | 93 |
| 4.3.1.3. Rasprostranjenost funkcionalnih gena uključenih u ciklus dušika u uzorcima geotermalne vode | 100 |
| 4.3.1.4. Utjecaj uvjeta uzgoja na razvoj nitrifikanata | 102 |
| 4.3.1.4.1. Najpovoljniji uvjeti uzgoja za pojavu gena važnih u ciklusu dušika | 102 |
| 4.3.1.4.2. Najpovoljniji uvjeti uzgoja za pojavu mikrobne zajednice važne u ciklusu dušika po lokalitetima | 107 |
| 4.3.2. Biološka obrada procjedne vode biootpada | 111 |
| 4.3.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva procjedne vode biootpada tijekom biostimulacije i bioaugmentacije | 111 |
| 4.3.2.2. Struktura zajednice prokariota | 114 |
| 4.3.2.3. Struktura zajednice eukariota..... | 116 |
| 4.3.2.4. Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na strukturu prokariotske i eukariotske mikrobne zajednice tijekom biološke obrade procjedne vode biootpada..... | 118 |
| 4.3.2.5. Prikaz sastava zajednice fluorescentnom mikroskopijom | 122 |
| 5. RASPRAVA | 126 |
| 5.1. Prva faza istraživanja | 127 |
| 5.1.1. Temperatura, pH vrijednost i nutrijenti kao najznačajniji parametri oblikovanja mikrobne zajednice prokariota..... | 127 |
| 5.1.2. Analiza strukture mikrobne zajednice prokariota..... | 127 |
| 5.1.3. Prostorno – vremenske razlike geotermalnih voda u Hrvatskoj | 130 |
| 5.1.4. Analiza pretpostavljenih metaboličkih funkcija prokariota u geotermalnim vodama Hrvatske | 132 |
| 5.1.5. Analiza rezultata matematičkih modela uzročnosti | 133 |

| | |
|--|------------|
| 5.2. Druga faza istraživanja..... | 135 |
| 5.2.1. Problematika istraživanja mikrobne zajednice eukariota | 135 |
| 5.2.2. Struktura eukariotske mikrobne zajednice..... | 136 |
| 5.2.3. Utjecaj abiotičkih čimbenika na sastav mikrobnih eukariota i mogući biotehnoški potencijal identificiranih eukariotskih mikroalgi | 138 |
| 5.3. Treća faza istraživanja..... | 141 |
| 5.3.1. Uzgoj kultura | 141 |
| 5.3.1.1. Stabilnost fizikalno-kemijskih parametara | 141 |
| 5.3.1.2. Analiza sastava mikrobne zajednice prokariota u uzgojenim kulturama | 141 |
| 5.3.1.3. Rasprostranjenost funkcionalnih gena uključenih u ciklus dušika u vodi i uzgojenim kulturama | 143 |
| 5.3.1.4. Optimalni uvjeti razvoja nitrificirajućih mikroorganizama | 144 |
| 5.3.2. Biološka obrada procjedne vode biootpada | 146 |
| 5.3.2.1. Sastav procjedne vode u provedenim pokusima | 147 |
| 5.3.2.2. Analiza strukture mikrobnih zajednica prokariota i eukariota tijekom biološke obrade procjednih voda biootpada | 149 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 152 |
| 7. LITERATURA..... | 157 |
| 8. PRILOZI..... | 180 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 199 |
| 9.1. Popis objavljenih znanstvenih radova | 201 |
| 9.2. Popis sažetaka u zbornicima skupova | 201 |

1. UVOD

Na području Republike Hrvatske postoji veliki broj geotermalnih lokaliteta s različitim hidrokemijskim i hidrogeološkim značajkama. Utjecaj tih značajki, osobito utjecaj temperature, oblikuje strukturu mikrobnih zajednica u različitim ekološkim nišama geotermalnih voda. Prethodna istraživanja ukazuju da je biološka raznolikost i brojnost mikroorganizama smanjena u geotermalnim vodama u usporedbi s drugim vodenim staništima (Moeck, 2014; Valeriani i sur., 2018). Na sastav mikrobnih zajednica u geotermalnim vodama veliki utjecaj imaju različiti fizikalno-kemijski parametri poput temperature, pH, koncentracije otopljenog kisika te dostupnost hranjivih tvari (Huang i sur., 2021; Lagostina i sur., 2021), iako ponekad to nije slučaj (Kormas i sur., 2009). Biološke interakcije između mikroorganizama snažno utječu na svojstva mikrobnih zajednica kao što je rast pojedinih vrsta i sastav cjelokupne zajednice (Schink, 2002; Nadell i sur., 2016). Osim fizikalno-kemijskih svojstava i bioloških interakcija na oblikovanje strukture mikrobne zajednice značajan utjecaj imaju i hidrogeološka i geološka svojstva te time i utjecaj biogeografije (Huang i sur., 2011; Inskeep i sur., 2013). Različitim kombinacijama hidrogeoloških, geoloških i biogeografskih karakteristika geotermalnih voda dolazi do njihove klasifikacije u različite vrste vodonosnika.

Dugo se smatralo da većina istraživanih ekstremofila pripada upravo domeni Archaea (Eme i Doolittle, 2015). Međutim, tijekom proteklog desetljeća otkriveno je mnogo mikrobnih vrsta koje su prilagođene životu i proliferaciji u ekstremnim uvjetima, a pripadaju domenama Bacteria i Eukaryota (van den Burg, 2003). Utvrđeno je da su mikrobne zajednice u geotermalnim vodama sastavljene od filogenetski raznolikih mikroorganizama prilagođenih različitim ekstremnim uvjetima okoliša, kao što su temperatura (termofili), salinitet (halofili), tlak (piezofili) i pH vrijednost (acidofili i alkalofili) (Adiguzel i sur., 2009). Zahvaljujući njihovoj sposobnosti prilagodbe i rasta u ekstremnim uvjetima kao što je visoka temperatura, provedena su brojna istraživanja s ciljem otkrivanja njihovih fizioloških svojstava.

Među raznolikim vrstama ekstremofila, posebna pažnja znanstvenika usmjerena je prema termofilima, što je uglavnom posljedica njihovog značajnog biotehnološkog potencijala (van den Burg, 2003; Adiguzel i sur., 2009). Istraživanja su, na primjer, pokazala da dostupnost dušikovih i sumpornih spojeva, kao glavnih nutrijenata te njihovi međusobni omjeri predstavljaju ključnu ulogu u oblikovanju strukture mikrobne zajednice (Yazdi i sur., 2014; Huang i sur., 2021; Lagostina i sur., 2021). Geotermalne vode, s obzirom na dihotomiju mikroorganizama koji obavljaju oksidaciju i redukciju dušikovih i sumpornih spojeva, predstavljaju iznimno raznoliko stanište brojnih bakterija i arheja s pripadajućim enzimima. Posebno se ističu enzimi koji su karakteristični za reakcije poput nitrifikacije i denitrifikacije,

odnosno ključne komponente procesa bioremedijacije, kao i za druge potencijalne biotehnološke primjene (van den Burg, 2003; Jorquera i sur., 2019; Maddela i sur., 2022).

Istraživanje funkcionalnih karakteristika prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama često predstavlja izazov. Detaljno istraživanje fiziologije arheja i bakterija u većini slučajeva zahtijeva uzgoj pojedinih vrsta u čistim kulturama u laboratorijskim uvjetima kako bi se odredile njihove moguće funkcionalne karakteristike, no to je često izuzetno teško ostvarivo. Većinu prokariota (99 %) nije moguće uzgojiti u laboratoriju imitirajući *in situ* uvjete okoliša, stoga vrlo mali broj dosad poznatih prokariotskih koljena ima uzgojene predstavnike u čistim kulturama (Su i sur., 2012). Budući da metode zasnovane samo na uzgoju nisu bile dovoljne za dobivanje rezultata o strukturi i raznolikosti mikrobnih zajednica u različitim staništima, razvijene su suvremenije metode za identifikaciju i kvantifikaciju mikroorganizama od interesa, poput analize ribosomalne RNA (rRNA) molekule. Ovaj pristup identifikaciji primjenjuje se na gen 16S rRNA, koji je najčešće korišten filogenetski marker za identifikaciju sastava prokariotskih mikrobnih zajednica. Nadalje, analiza gena 18S rRNA omogućuje identifikaciju eukariotskih mikroorganizama (Kirchman, 2008; Su i sur., 2012). Razvoj metoda sekvenciranja nove generacije (NGS, engl. *Next Generation Sequencing*) omogućio je detaljniji uvid u mikrobnu raznolikost (Tan i sur., 2015; Lojo-Kadrić i sur., 2018), posebno kada je riječ o prokariotskoj raznolikosti čije se baze podataka neprestano popunjavaju novim sekvencama i pripadajućom taksonomijom, za razliku od eukariotske raznolikosti koja je općenito manje istražena. Unatoč razvoju metagenomike, metatranskriptomike i metaproteomike, brojna istraživanja u mikrobnj ekolojiji i dalje se često temelje na analizi 16S i 18S rRNA gena (Albertsen i sur., 2015; Karst i sur., 2016; Lojo-Kadrić, 2018).

Također, primjećuje se značajan napredak u području umjetne inteligencije (AI, engl. *artificial intelligence*) i primjene analize uzročnosti (kauzalnost). Napredak proizlazi iz razvoja brojnih novih algoritama i njihove primjene u istraživanju novih i poboljšanju postojećih procesa s ciljem dubljeg razumijevanja složenih sustava i analize velikih skupova podataka (Solvang i Subbey, 2019; Kurtanjek, 2021). Na primjer, jedan pristup procjeni utjecaja fizikalno-kemijskih parametara na mikrobnu raznolikost može se temeljiti na matematičkim strukturnim modelima uzročnosti. Strukturno uzročni model dobiven na ovaj način nadilazi promatrane eksperimentalne dokaze i može se koristiti za predviđanje utjecaja fizikalno-kemijskih parametara na mikrobnu raznolikost u istraživanim ekosustavima. Ovaj pristup donosi brojne prednosti, uključujući smanjenje eksperimentalnog napora i pojednostavljenje odabira uvjeta uzgoja specifičnih mikroorganizama s izraženim biotehnološkim potencijalom,

kao što je primjena u procesima bioremedijacije (Rezić i sur., 2021; Diemer i sur., 2021; Arif i MacNeil, 2022).

Geološki, teritorij Hrvatske je podijeljen na dva segmenta: panonski dio na sjeveru/sjeveroistoku i dinarski dio na jugu/jugozapadu. Sjeverni dio Hrvatske predstavlja jugozapadni rub Panonskog bazenskog sustava (PBS, engl. *Pannonian Basin System*), a točna granica između ova dva prostora je južni rub Savske potoline. Panonski dio Hrvatske obilježava izrazito visok prosječni geotermalni gradijent ($49\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{km}$) i površinski protok topline ($76\text{ mW}/\text{m}^2$) (Bošnjak i sur., 1998). Ovi povoljni geotermalni uvjeti na tom području proizlaze iz prisutnosti plitkog Mohorovičićevog seizmičkog diskontinuiteta, što je granica između Zemljine kore i plašta, koja se nalazi na dubini od 25 do 28 km (Aljinović i Blašković, 1984; Šumanovac i sur., 2009; Šumanovac i sur., 2016). Zahvaljujući povoljnim geološkim uvjetima, geotermalni lokaliteti su česti na tom području, a mnogi od njih su balneološka odredišta, tj. rehabilitacijski i rekreacijski centri, poput Varaždinskih, Krapinskih, Stubičkih, Daruvarskih i drugih toplica. S druge strane, južni/jugozapadni dio Hrvatske (Dinarska regija - Gorska Hrvatska, Istra, Kvarner i Dalmacija) nema tako povoljne uvjete za nastanak geotermalnih voda. Na tom području, Mohorovičićev seizmički diskontinuitet je dublji, nalazi se na dubini od oko 50 km ispod površine, što rezultira nižim prosječnim geotermalnim gradijentom ($18\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{km}$) i površinskim protokom topline ($29\text{ mW}/\text{m}^2$) (Bošnjak i sur., 1998). Unatoč tome, na tom području su se razvili neki niskotemperaturni geotermalni lokaliteti ($< 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), a najpoznatiji izvor jesu Istarske toplice.

Iako je komercijalno iskorištavanje geotermalnih voda u Hrvatskoj već u tijeku, njihov biotehnološki potencijal još uvijek nije temeljito istražen. Nažalost, ekologija mikroorganizama u ovom specifičnom okruženju nije dovoljno proučena, a prema našim saznanjima do danas nisu provedena istraživanja mikrobne raznolikosti hrvatskih geotermalnih voda. Za buduća istraživanja ključno je detaljnije upoznati bioraznolikost mikrobnih zajednica koje obitavaju u ovom ekstremnom okruženju što predstavlja neophodan prvi korak u razumijevanju metabolizma prevladavajućih mikroorganizama na geotermalnim lokalitetima s iznimnim biotehnološkim potencijalom, kao i u uspostavljanju veza između strukture mikrobne zajednice i fizikalno-kemijskih svojstava geotermalnih voda.

U ovom istraživanju, odabrano je 19 geotermalnih lokaliteta, uglavnom smještenih u središnjoj i istočnoj Hrvatskoj, kako bi se provela osnovna karakterizacija prokariotskih i eukariotskih mikrobnih zajednica i utvrdio sezonski hidrokemijski sastav te kako bi se na taj način prikupile informacije o potencijalnom biotehnološkom kapacitetu geotermalnih voda Hrvatske. Ovo istraživanje ima tri glavna cilja i formulira tri glavne hipoteze.

Ciljevi istraživanja su:

1. Istražiti sastav mikrobnih zajednica prokariota i eukariota u geotermalnim vodama u Hrvatskoj te utvrditi postojanje prostorno-vremenskih razlika i abiotičke čimbenike koji utječu na oblikovanje strukture mikrobnih zajednica.
2. Identificirati i istražiti mikrobne zajednice koje koriste dušikove spojeve kao supstrat za rast i razvoj.
3. Prepoznati geotermalne lokalitete s izraženim biotehnoškim potencijalom u Hrvatskoj.

Glavne istraživačke hipoteze su:

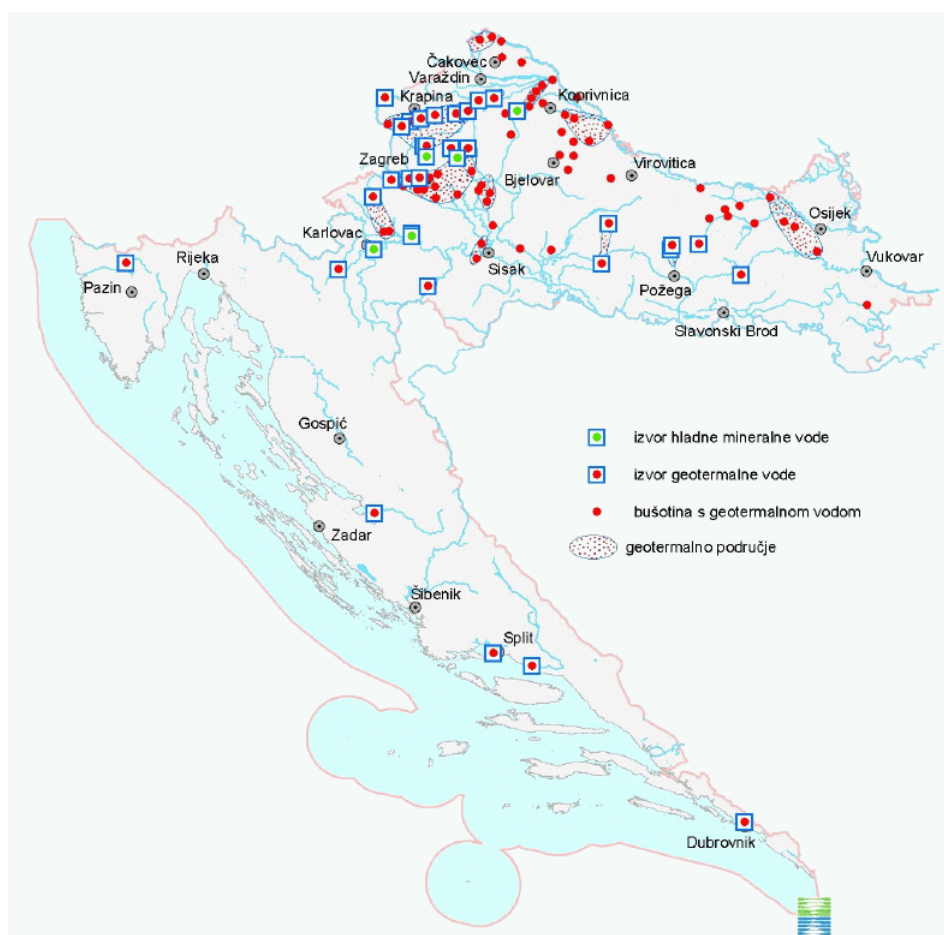
1. Temperatura i pH vrijednost glavni su abiotički faktori koji utječu na razvoj i oblikovanje prokariotskih i eukariotskih mikrobnih zajednica u geotermalnim vodama Hrvatske.
2. Dostupnost nutrijenata poput dušika i sumpora je determinirajući modifikator zajednice prokariota u geotermalnim vodama po pojedinim lokalitetima.
3. Prostorno-vremenska razlika pronađenih mikrobnih zajednica u geotermalnim vodama Hrvatske je minimalna zbog stabilnih geotermalnih karakteristika istraživanih vodonosnika.

Znanstveni doprinos ove disertacije temelji se na praćenju mikrobne zajednice *in situ* i njihovim odgovorima na različite abiotičke čimbenike korištenjem visoko-protočne metode sekvenciranja eDNA, primjenom statističkih testova i analiza, matematičkih modela uzročnosti te metoda uzgoja. Ovim istraživanjem će se prvi put dobiti uvid u sastav i raznolikost prokariotske i eukariotske mikrobne zajednice u najznačajnijim geotermalnim vodama u Hrvatskoj, koje se trenutno uglavnom koriste u balneološke svrhe. Također, ova disertacija pruža nove uvide u metode uzgoja prokariotskih ekstremofila na području Hrvatske s posebnim naglaskom na mikroorganizme koji sudjeluju u procesu nitrifikacije. Konačno, dobit će se preliminarni uvid u mogući biotehnoški potencijal istraženih geotermalnih voda u Hrvatskoj poput bioremedijacije, što se sada može dalje istraživati.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Geotermalne vode Republike Hrvatske

Geotermalne vode (grč. geo = zemlja, grč. therme = toplina) pripadaju ekstremnim staništima prvenstveno definiranim i ograničenim povišenom temperaturom. Obuhvaćaju sve vode s temperaturom većom od srednje godišnje temperature zraka na mjestu gdje se nalazi izvor (Cole i sur., 2013; Amin i sur., 2017). Ta područja predstavljaju ekološko, obnovljivo i prirodno bogatstvo koje se iskorištava upravo zbog svoje ljekovitosti i pogodnih temperatura. Na području Hrvatske zabilježeno je više od 25 nalazišta geotermalnih izvora, od kojih je njih 18 trenutno aktivnih toplica (Slika 1).



Slika 1. Poznata nalazišta izvora geotermalne vode s postupno stvorenim bušotinama na području Hrvatske (preuzeto: Narodne novine br. 91/2008).

Zahvaljujući dugogodišnjoj tradiciji korištenja prirodne geotermalne vode u balneologiji (lat. balneum = kupelj, grč. logos = znanost), većina geotermalnih izvora na području Hrvatske poznata je još od rimskog doba. Arheološki podaci, kao i prisutnost fosilnih

ostataka u sedrenoj špilji i velike količine taložene sedre, upućuju na to da se Varaždinske toplice (lat. *Aquae Iasae*) smatraju najstarijim termalnim izvorima (> 40 000 godina) na području Panonske ravnice (Šimunić, 1988). Osim toga, Varaždinske toplice su najpoznatije i najveće toplice u Hrvatskoj. Arheološki nalazi svjedoče i o postojanju Daruvarskih toplica (lat. *Aquae Balissae*), Krapinskih toplica (lat. *Aquae Vivae*) i Topuskog (lat. *Ad fines*) koji potječu također iz rimskog razdoblja. Spomenute toplice su s vremenom prerasle u moderne lječilišne centre i sve su češće korištene od 18. stoljeća (Schejbal, 2003).

Geotermalne vode mogu se klasificirati na temelju hidrogeoloških, geoloških i termičkih svojstava (Moeck, 2014). S obzirom na temperaturu mogu se podijeliti na: 1) subtermalne vode (13 – 20 °C), 2) hipotermalne vode (20 – 34 °C), 3) homeotermalne vode (34 – 38 °C) i hipertermalne vode (> 38 °C) (Tablica 1) (Marković, 2002). Različite hidrogeološke karakteristike također uzrokuju razlike u kemijskom sastavu geotermalnih voda, pri čemu neke imaju veću mineralizaciju od drugih, s obzirom na činjenicu da su podzemne vode uvijek mineralizirane (Tablica 1). Takva se voda često koristi kao voda za piće, a na tim područjima često se nalaze i tvornice, kao što je primjerice lipički Studenac, gdje se crpi gazirana prirodna mineralna voda s dubine do 380 m. Precizan kemijski sastav voda određuje se brojnim kemijskim analizama koje mjere koncentracije otopljenih tvari kao što su ioni Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , SO_4^{2-} , koji često pokazuju prostornu i vremensku varijabilnost.

Nadalje, geotermalni lokaliteti dijele se u dvije kategorije na prirodne izvore i bušotine pri čemu je glavna razlika u mjestu toka vode. Antropogene potrebe za većom količinom vode i lakšom eksploatacijom doveli su do stvaranja struktura poput bušotina. Ponekad se na maloj udaljenosti nalazi više izvora ili bušotina izvedenih iz istog prirodnog izvora. Prirodne geotermalne vode poprimaju kemijski sastav prolaskom kroz vodonosnik i otapanjem minerala iz stijena kroz koje prolaze. Stoga, kemijski sastav vode ovisi o sastavu stijena i topljivosti pojedinih minerala. Primjerice, geološka istraživanja geotermalnih voda na području Hrvatske pokazuju da Stubičke toplice karakteriziraju kalcij-hidrogenkarbonati (Miholić, 1944), Daruvarske toplice prema hidrokemijskim značajkama karakteriziraju dolomiti i vapnenac (Marković, 2012; Borović i Marković, 2015), dok je jezgra izvora geotermalne vode u Varaždinskim toplicama sastavljena od karbonatnih stijena trijasko starosti (Srpak i Sabol, 2019). Na temelju svih ovih podjela, geotermalni lokaliteti u Hrvatskoj međusobno se razlikuju, prvenstveno po temperaturi vode, ali i prema kemijskom sastavu i vrsti vodonosnika te prema načinu korištenja (Prilog 1).

Tablica 1. Podjela geotermalne vode s obzirom na temperaturu i prisutne elemente u tragovima/minerale (preuzeto i prilagođeno prema: Marković, 2002).

| Naziv geotermalne vode | Karakteristika |
|----------------------------------|--|
| Hladna | < 20 °C |
| Hipotermalna | 20 – 34 °C |
| Homeotermalna/izotermalna | 34 – 38 °C |
| Hipertermalna | > 38 °C |
| Mineralna | > 1 g/L |
| Željezovita | > 10 mg/kg Fe |
| Arsenska | > 0,7 mg/kg (As) |
| Fluorna | > 2 mg/kg (F) |
| Jodna | > 1 mg/kg (I) |
| Kiselica | > 1000 mg/kg (CO ₂) |
| Sumporna | > 1 mg/kg (H ₂ S, HS ⁻) |
| Radonska (radioaktivna) | > 2,2 u n ^c /L |
| Radijska (radioaktivna) | > 0,1 u n ^c /L |

Većina geotermalnih istraživanja usmjerena je prema područjima s većim geotermalnim gradijentom, što omogućuje bušenje geotermalnog polja na plićem području (Lundl i sur., 2008). Geotermalna istraživanja u Hrvatskoj započela su 1960-ih godina prilikom istraživanja geotermalnih ležišta u potrazi za naftom i zemnim plinom. Tijekom godina otkriveno je nekoliko geotermalnih ležišta diljem Hrvatske, pri čemu su se najznačajnijima pokazala područja Bizovca i Zagreba (Slika 1).

Geotermalno polje Bizovca otkriveno je 1967. godine, nakon čega je izgrađeno nekoliko bušotina. Voda se i danas crpi s dubine od 1667 - 1841 metara, pri čemu temperatura vode doseže do 96,8 °C, no spušta se na 43 °C radi terapijskih i energetske svrha za zagrijavanje prostora. Na geotermalnom polju Bizovac postoji ukupno tri bušotine te nisu sve u aktivnoj upotrebi (Energetski institut Hrvoje Požar, 2017).

Na geotermalnom polju Zagreb, veličine oko 54 km², ležište tople vode nalazi se na dubini od 730 m do 1406 m. Na tom području izgrađeno je 14 bušotina s geotermalnom vodom čija je početna temperatura iznosila oko 70 °C, a danas je narasla na 80 °C. Povećanje temperature rezultat je visoke okomite propusnosti na tom geotermalnom polju, što ubrzava konvekciju i prijenos topline iz dubljih u pliće ležište. Glavni cilj izgradnje tih bušotina bio je

opskrba Športskog rekreativnog parka Mladost i Sveučilišne bolnice, koja je tada bila u izgradnji, no ta je izgradnja na kraju ostala nedovršena. Probna eksploatacija tople vode započela je 1981. godine, a danas se geotermalna voda na području Zagreba eksploatira kroz tehnološki sustav na lokacijama Mladost, Blato i Lučko. Geotermalna voda najviše se koristi za grijanje bazena i objekata unutar ŠRC Mladost, grijanje skladišnih prostora u Kliničkoj bolnici Novi Zagreb i dogrijavanje poslovnih objekata u poslovnoj zoni Lučko (Jurilj i Cazin, 2019).

Daljnijim istraživanjem potencijalnih nalazišta nafte za potrebe INA-e, 1980. godine otkriven je geotermalni potencijal bjelovarske subdepresije (Slika 1). Na području Velike Ciglene utvrđeno je energetska najpovoljnije geotermalno ležište gdje je otkrivena termalna voda temperature 172 °C na dubini do 2500 m. Zbog izrazito velikog geotermalnog potencijala od 50 MWt i temperaturnog gradijenta od 0,062 °C/m, 2018. godine izgrađena je prva hrvatska geotermalna elektrana koja koristi termalnu vodu od oko 170 °C s organskim Rankineovim ciklusom, a proizvedena električna energija se isporučuje u javnu mrežu (Guzović i sur., 2014).

Istraživanja navedenih lokaliteta označila su početak geotermalnih istraživanja u Hrvatskoj koja su se nastavila na području PBS-a s povoljnim geotermalnim karakteristikama, posebice zbog mogućnosti izravne upotrebe toplinske energije (Škrlec i sur., 2019). Vremenom je broj bušotina na raznim eksploatacijskim poljima diljem Hrvatske rastao, a češće su se provodili geološki monitorinzi geotermalnih izvora i bušotina kako bi se istaknula važnost geotermalnih resursa i potaknula njihova eksploatacija, kao i ciklusi investicija na mnogim geotermalnim poljima.

Važnost geotermalnih voda u Hrvatskoj, prvenstveno toplica raste sve više zbog zdravstvenog turizma. Osim što se koriste u balneološke svrhe, određeni geotermalni lokaliteti se eksploatiraju za individualno grijanje prostora, proizvodnju električne energije, uzgoj ribe, javnu vodoopskrbu te stakleničku proizvodnju povrća. Potencijal za eksploataciju brojnih izrađenih bušotina i prirodnih izvora geotermalne vode (Slika 1) znatno nadmašuje trenutno korištenje i potrebe na području Hrvatske. Unatoč tome, ti izvori se nedovoljno koriste bez opravdanog razloga. S obzirom na nisku razinu iskorištavanja kapaciteta geotermalnih ležišta, nužno je ukazivati na razne mogućnosti korištenja prirodnog resursa geotermalne energije kao obnovljivog izvora energije, kao i na biotehnološke potencijale korištenja geotermalne vode i termofilnih mikroorganizama. Uporaba geotermalne energije i tople vode pruža mogućnosti za raznolike projekte, od kojih su neki već aktivni, uključujući iskorištavanje električne i toplinske energije za grijanje objekata u stambenim naseljima, izgradnju hortikulturnih centara, staklenika i vodenih parkova, iskorištavanje geotermalne vode kao balneološkog resursa i

lječilišta te obogaćivanje turističke ponude cijele zemlje. Nasuprot tome, biotehnološki potencijali i znanstvena mikrobiološka istraživanja geotermalnih voda na području Hrvatske su dosad u potpunosti zanemarena. Prirodne geotermalne vode s termofilnim mikroorganizmima i njihovim metaboličkim produktima mogu se upotrijebiti u različite svrhe, poput pročišćavanja otpadnih voda, razgradnje biootpada, proizvodnje biogoriva te u raznim procesima prehrambene, farmaceutske, tekstilne i drugih industrija. Takva primjena geotermalnih resursa ne samo da bi obogatila turističku ponudu zemlje, već bi i pridonijela ekonomski održivom razvoju. S obzirom na raznolikost izvora geotermalne vode i mogućnost njihove primjene, važno je naglasiti da će se njihovim korištenjem na ekološki prihvatljiv način pridonijeti gospodarskom razvoju Hrvatske.

2.2. Raznolikost i važnost mikrobnih zajednica u geotermalnim vodama svijeta

Ekstremofili su organizmi koje karakterizira optimalni rast i razvoj u ekstremnim uvjetima života poput visoke temperature i pH vrijednosti, visokog tlaka i saliniteta ili čak pojačane radijacije. Osim Archaea, otkriće ekstremofila unutar domena Bacteria i Eukaryota ukazuje na širu raznolikost i sposobnost mikroorganizama da se prilagode raznim uvjetima okoliša. Unatoč napretku u istraživanju, još uvijek postoji veliki broj mikroorganizama čije prilagodbe na ekstremne uvjete života nisu dovoljno istražene i opisane (van den Burg, 2003). U raznim ekosustavima, pa tako i u geotermalnim vodama, mikrobne zajednice prokariota i eukariota stvaraju kompleksnu mrežu punu bioloških interakcija s značajnim ulogama u održavanju ravnoteže i funkcioniranju ekosustava. Predstavnici mikrobnih eukariota poput fitoplanktona fiksiraju CO₂ i stvaraju organske spojeve, dok heterotrofne bakterije metabolički obrađuju nastalu organsku tvar za rast i opskrbu energijom (Medeiros i sur., 2017). Dokazano je da bakterije mineraliziraju organsku tvar nastalu aktivnošću fitoplanktona. Istovremeno, bakterije i fitoplankton služe kao izvor hrane za druge eukariote poput mikrozooplanktona te njihovim metabolizmom, osim organske tvari, dolazi do ispuštanja nutrijenata poput dušika i fosfora u ekosustav. Nutrijenti su od vitalnog značaja za razvoj bakterija i fitoplanktona, a kao rezultat akumulira se biomasa i proizvodi organska tvar, čime se započinje novi ciklus (Durham i sur., 2019; Fu i sur., 2020). Osim što ti organizmi doprinose opskrbi hranjivim tvarima, također osiguravaju recikliranje elemenata poput dušika i fosfora, koji su ključni za vitalne biokemijske procese. Proučavanje ove složene interakcije pruža uvid u održivost i stabilnost različitih vodenih ekosustava te može pružiti smjernice za očuvanje njihove produktivnosti i otpornosti na promjene u okolišu.

2.2.1. Prokarioti

Prokarioti, jedna od najbrojnijih i najraznolikijih skupina živih organizama, naseljavaju različite ekosustave širom svijeta, uključujući zrak, tlo i vodu. Njihova prisutnost u različitim životnim sredinama i klimatskim zonama svrstava ih u kozmopolitske organizme (Duraković, 1991; Sriaporn, 2022). Bakterije i arheje, koje se nalaze u različitim ekosustavima, uključujući i geotermalne vode, obavljaju različite funkcionalne uloge od primarnih proizvođača do razlagača. Stoga, ove mikroorganizme smatramo izuzetno važnim funkcionalnim komponentama svakog ekosustava jer sudjeluju u mnogim neophodnim biogeokemijskim ciklusima, uključujući cikluse ugljika, dušika i sumpora (Stein i Klotz, 2016; Takai, 2019; Reichle, 2019; Frolov i sur., 2021).

Prokariotske mikrobne zajednice geotermalnih voda čine izvrstan primjer mikroorganizama koji obitavaju u ekstremnim životnim uvjetima (Inskeep i sur., 2013; Valeriani i sur., 2018). Najviše su proučene mikrobne zajednice geotermalnih voda najpoznatijeg Nacionalnog parka Yellowstone (Podar i sur., 2020; Colman i sur., 2022; Peach i sur., 2022) i poluotoka Kamčatka (Wemheuer i sur., 2013; Merkel i sur., 2017; Frolov i sur., 2021). Jedinstvene geotermalne vode s zanimljivim mikrobnim zajednicama prisutne su i istraživane i na drugim područjima bogatim toplim izvorima poput Novog Zelanda (Power i sur., 2018), Turske (Adiguzel i sur., 2009; Celik i Keskin, 2022) i Islanda (Podar i sur., 2020). Sva ova istraživanja rezultiraju brojnim znanstvenim radovima koji doprinose razumijevanju ovih fascinantnih mikrobnih staništa.

Nacionalni park Yellowstone je poznat po svojim 300 gejzira, čije je istraživanje imalo revolucionaran utjecaj kako u znanstvenom, tako i u industrijskom svijetu. U kasnim 1960-im, na ovom području je pronađena bakterija *Thermus aquaticus*, što je dovelo do otkrića i izolacije Taq polimeraze, koja je postala najpoznatiji primjer upotrebe enzima izoliranog iz bakterija u biotehnoške svrhe (Brock i Freeze, 1969; Chien i sur., 1976). Svakodnevna upotreba Taq polimeraze u metodama molekularne biologije ukazuje na činjenicu da geotermalne vode sadrže filogenetski raznolike mikroorganizme koji su prilagođeni ekstremnim uvjetima okoliša te su stoga potencijalno vrlo vrijedni u biotehnologiji (Jorquera i sur., 2019).

Razne kombinacije abiotičkih i biotičkih čimbenika geotermalnih voda stvaraju pogodne uvjete za razvoj različitih prokariotskih organizama (Hou i sur., 2013; Wemheuer i sur., 2013; Power i sur., 2018). Rezultati dosadašnjih znanstvenih istraživanja ukazuju na učestalu prisutnost bakterijskih koljena Bacteroidetes, Chloroflexi, Cyanobacteria, Firmicutes, Nitrospirota i Proteobacteria u geotermalnim vodama (Power i sur., 2018; Valeriani i sur., 2018; Podar i sur., 2020). Također, u ovim vodama često prevladavaju predstavnici koljena

Actinobacteria, gram-pozitivne bakterije poznate kao sekundarni proizvođači farmakološki važnih metabolita (Jiang i sur., 2013). Često se ističe i dominacija bakterija (99,21 %) u odnosu na arheje i eukariote (eukarioti - 0,43 %, arheje - 0,11 %), pri čemu se ove proporcije mogu razlikovati ovisno o izvoru vode (Mangrola i sur., 2015).

2.2.2. Eukarioti

U početku razvoja mikrobne ekologije, istraživanja su uglavnom bila usmjerena na proučavanje raznolikosti prokariotskih organizama, dok je postojanje eukariotskih zajednica (protista) često zanemarivano. Tek kasnije, fokus istraživanja proširio se i na proučavanje eukariotskih zajednica u raznim staništima, iako su i dalje manje istraživane u usporedbi s prokariotskim organizmima. Kao rezultat toga, baze podataka uglavnom sadrže više informacija o prokariotskim sekvencama i taksonomiji, dok sadržavaju puno manje potrebnih informacija o eukariotima vezanih za većinu vodenih staništa, a posebice onih u ekstremnim okruženjima kao što su geotermalne vode. Zbog nepotpunosti podataka, mikrobnih eukarioti često nisu formalno svrstani u 7 glavnih taksonomskih kategorija (vrsta, rod, porodica, red, razred, koljeno, carstvo). Prilikom dodjeljivanja taksonomije, ovisno o korištenoj bazi podataka, često dolazi do njihovog razvrstavanja u kategorije poput supergrupa i divizija, kao što je slučaj pri korištenju podataka iz PR² baze (v 4.13., Guillou i sur., 2013).

Protisti su jednostanični ubikvitarni organizmi, također s različitim funkcionalnim ulogama. Često su neophodni organizmi bitni za mnoge procese unutar ekosustava, no unatoč tome proučavanje njihove raznolikosti i dinamike ostaje zanemareno u mnogim staništima. Ova nedovoljna pažnja može proizaći iz paradigme da su eukariotski organizmi manje prilagođeni ekstremnim uvjetima okoliša, dok su bakterije i arheje smatrane glavnim predstavnicima u takvim okruženjima. Međutim, sve veći broj dokaza sugerira da protisti nisu samo prisutni, već i aktivni u mnogim ekstremnim staništima. Stoga je važno preispitati tu paradigmu i uključiti proučavanje protista kako bismo bolje razumjeli njihovu ulogu u tom jedinstvenom staništu (Oliverio i sur., 2018).

Ranija literatura o geotermalnim vodama sugerirala je da se termofilni protisti pojavljuju na temperaturama do 60 °C (Brock, 1973), a kasnije se otkrilo da neki protisti mogu preživjeti i na temperaturama do 70 °C (Brown i Wolfe, 2006). Amebe su jedne od prvih utvrđenih predstavnika protista u geotermalnim vodama (Ramaley i sur., 2001; Baumgartner i sur., 2003). Fototrofi, uključujući dijatomeje i predstavnike koljena Chlorophyta (zelene alge), uz visoku temperaturu, mogu podnijeti i kisele uvjete, kao i predstavnica koljena Euglenozoa

Euglena (Pumas i sur., 2018). Oliverio i sur. (2018) ukazali su da su ekstremne vrijednosti pH povezane sa smanjenjem raznolikosti i distribucije protista, dok geotermalne vode s visokom temperaturom karakterizira puno veća raznolikost protista. Uz amebe i zelene alge, trepetljikaši (Ciliophora) su česti predstavnici eukariotskih mikrobnih zajednica (Oliverio i sur., 2018). Kombinacija abiotičkih parametara poput pH vrijednosti od 2,8 do 7 te uvjeti visoke koncentracije teških metala (Ni, Zn, Cu, Fe) pokazali su se povoljnim za razvoj brojnih vrsta unutar koljena Bacillariophyta, Chlorophyta, Rhodophyta i Euglenophyta, kao i za prisutnost heterotrofnih predstavnika Ciliophora i Amoebozoa (Aguilera i sur., 2010).

Unatoč ovim primjerima prilagodbe protista ekstremnim uvjetima života, istraživanja raznolikosti eukariota ograničena su na tek nekoliko geotermalnih izvora diljem svijeta (Brown i Wolfe, 2006; Aguilera i sur., 2010; Oliverio i sur., 2018; Pumas i sur., 2018; Brown i Fritz, 2019). Ipak, iz drugih radova provedenih na ostalim tipovima staništa poput tla, morskih i drugih slatkovodnih ekosustava, dobro je poznato da su protisti vrlo važan dio svakog ekosustava u kojem sudjeluju kao primarni proizvođači, paraziti, predatori i razlagači (Levinsen i sur., 2000; Wardle, 2006; Geisen i sur., 2015). Stoga, postoji opravdan razlog za istraživanje i očekivanje da će geotermalna staništa vjerojatno sadržavati nove i raznolike zajednice protista.

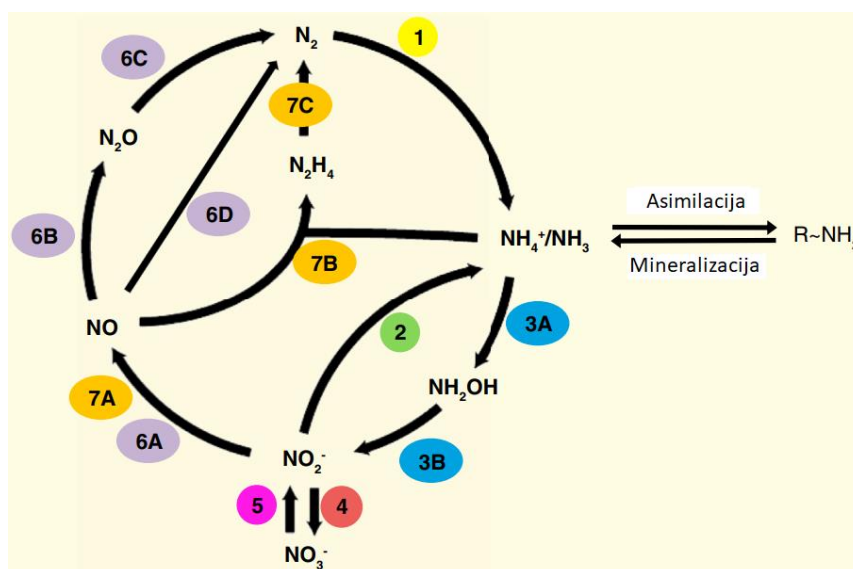
2.3. Biogeokemijski ciklus dušika

Dušik (N) je vrlo važan biogeni element koji se u prirodi pojavljuje u različitim oblicima. U atmosferi se nalazi u molekularnom N₂ obliku te takav atmosferski dušik čini oko 50 % ukupnog dušika na Zemlji. Ostatak dušika nalazi se u litosferi u magmatskim stijenkama koje vrlo malo sudjeluju u procesima kruženja dušika u prirodi. Budući da je takav oblik dušika biološki nedostupan i nisko reaktivan, dušik u stijenkama se isključuje iz procesa kruženja dušika. Oceani predstavljaju drugi najveći izvor dušikovih spojeva koji skupa sa N₂ sudjeluje u ciklusu dušika. Najveći dio dušika iz oceana nalazi se u oceanskim sedimentima i dubokim vodama što ukazuje na manji postotak kruženja dušika u oceanima u odnosu na ostale vodene ekosustave. Tlo, s druge strane, predstavlja važan izvor organskog oblika dušika, dok je dostupnost anorganskog dušika u tlu relativno niska (Palta i Hartnett, 2017; Myrold, 2021).

Ciklus dušika je kompleksna biokemijska transformacija koja uključuje razne dušikove spojeve i njihovo kruženje kroz atmosferu, kopnene i vodene ekosustave. Biljke, životinje i mikroorganizmi, poput bakterija, arheja i određenih protista, igraju ključnu ulogu u ovom ciklusu jer omogućuju prelazak dušika iz jednog oblika, koji je nedostupan drugim živim

bićima, u drugi oblik, koji je dostupniji. Ciklus dušika sastoji se od ukupno pet prihvaćenih procesa (sedam glavnih reakcija). Ti procesi uključuju:

- 1) amonifikaciju, koja obuhvaća fiksaciju dušika, kao i asimilacijsku i disimilacijsku redukciju nitrita/nitrata u amonijak (reakcije 1 i 2 na Slici 2),
- 2) nitrifikaciju (reakcije 3A, 3B i 4 na Slici 2),
- 3) denitrifikaciju (reakcije 6A-D na Slici 2),
- 4) anaerobnu oksidaciju amonijaka, poznata kao "anammox" proces (reakcije 7A-C na Slici 2),
- 5) interkonverziju nitrita i nitrata (reakcije 4 i 5 na Slici 2) (Stein i Klotz, 2016).



Slika 2. Glavni procesi ciklusa kruženja dušika u prirodi (preuzeto i prilagođeno prema: Stein i Klotz, 2016).

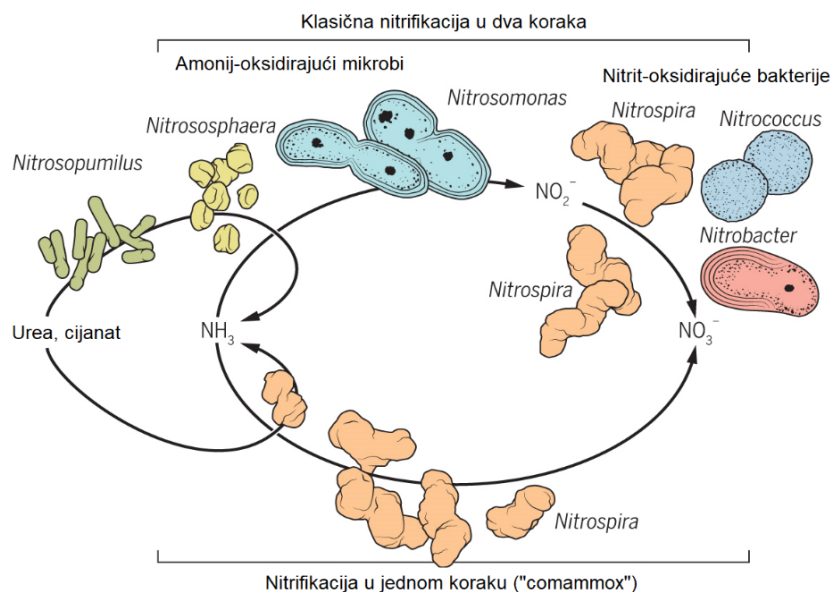
Od navedenih procesa, nitrifikacija i denitrifikacija su ključni procesi u kontekstu pročišćavanja otpadnih voda, kojima se učinkovito uklanjaju štetni dušikovi spojevi iz okoliša. Fokus i dublje razumijevanje njihovih mehanizama, omogućava bolju primjenu u rješavanju problema onečišćenja okoliša.

2.3.1. Nitrifikacija

Proces nitrifikacije sastoji se od oksidacije amonija (NH_4^+) u nitrit (NO_2^-) (Slika 3, reakcija 3) i oksidacije nitrita (NO_2^-) u nitrat (NO_3^-) (Slika 2, reakcija 4), a uključuje tri skupine mikroorganizama: I) oksidante amonija, II) oksidante nitrita i III) comammox organizme (engl. *complete ammonia oxidizers*, engl. prijevod: potpuni oksidanti $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$) koji oksidiraju NH_4^+

sve do NO_3^- u jednom koraku (Slika 2, reakcije 3A, 3B i 4; Slika 3). Oksidanti amonija (AOM, engl. prijevod: amonij-oksidirajući mikrobi, engl. *ammonia-oxidizing microbes*) mogu biti amonij-oksidirajuće arheje (AOA, engl. *ammonia-oxidizing archaea*) i amonij-oksidirajuće bakterije (AOB, engl. *ammonia-oxidizing bacteria*), dok su oksidanti nitrita nitrit-oksidirajuće bakterije (NOB, engl. *nitrite-oxidizing bacteria*) (Slika 3) (Pjevac i sur., 2017; Holmes i sur., 2019; Stein, 2019). Neki od kemolitotrofnih predstavnika Betaproteobacteria i Gammaproteobacteria te Crenarchaeota pripadaju oksidantima amonija. Isto tako, postoje metanotrofni i heterotrofni mikroorganizmi koji uspješno oksidiraju NH_4^+ u NO_2^- , ali iz njega ne koriste energiju za vlastiti razvoj (Stein i Klotz, 2016). Predstavnici skupina II i III uključuju kemolitotrofne mikroorganizme koji koriste NO_2^- , odnosno NH_4^+ kao jedine izvore energije za stanični rast i razvoj. NOB predstavnici pripadaju nekim razredima unutar koljena Proteobacteria i Nitrospirota, dok zasad poznati predstavnici comammox organizama pripadaju isključivo rodu *Nitrospira* (loza II, Slika 3) (Daims i sur., 2015; Pjevac i sur., 2017). Dosad poznate i uzgojene vrste *Nitrospira* koje također pripadaju lozi II poput *N. moscoviensis*, *N. japonica* i *N. lenta* dokazano ne mogu koristiti NH_4^+ kao supstrat, odnosno kao izvor energije za razliku od comammox organizama (Daims i sur., 2001; Ushiki i sur., 2013; Nowka i sur., 2015). Proizvedeni NO_2^- i NO_3^- u aerobnim reakcijama nitrifikacije mogu se interkonvertirati (Slika 2, reakcije 4 i 5) te mogu poslužiti kao supstrati u asimilacijskoj/disimilacijskoj redukciji nitrita/nitrata u amonijak (Slika 2, reakcija 2), a posljedično stvoreni NH_4^+ / NH_3 može se asimilirati (Slika 2) (Stein i Klotz, 2016; Myrold, 2021).

AOM i NOB nisu filogenetski blisko povezani i nemaju predstavnika koji može oksidirati oba supstrata (NH_4^+ i NO_2^-). Ova odvojena dva koraka u procesu nitrifikacije s različitim mikroorganizmima dovode do česte koagregacije AOM s NOB i interakcije unakrsnog hranjenja (engl. *cross-feeding interactions*) u takvom obliku konzorcija ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$). S druge strane, odvijanje potpune nitrifikacije oksidacijom NH_4^+ u NO_3^- , energetski je povoljnije te time comammox organizmi imaju prednost u rastu u odnosu na „nepotpune organizme“, kao što su AOM i NOB (Slika 3) (potpuna nitrifikacija - $\Delta G^{\circ} = -349$ kJ mol⁻¹ NH_3 ; oksidacija NH_4^+ - $\Delta G^{\circ} = -275$ kJ mol⁻¹ NH_3 i oksidacija NO_2^- - $G^{\circ} = -74$ kJ mol⁻¹ NO_2^-) (Daims i sur., 2015; Santoro, 2016).



Slika 3. Klasični i potpuni proces nitrifikacije s dosad poznatim predstavnicima nitrificirajućih mikroorganizama (preuzeto i prilagođeno prema: Santoro, 2016).

Klaster gena *amoCAB* skupa sa dva dodatna *amoC* gena kodira tri podjedinice enzima amonij monooksigenaze (AMO, podjedinica α , β i γ), od kojih *amoA* predstavlja funkcionalni i filogenetski marker za detekciju i identifikaciju AOM u mikrobnim zajednicama (Pester i sur., 2012; Pjevac i sur., 2017). AMO katalizira oksidaciju amonijaka u hidroksilamin (NH_2OH), nakon čega hidroksilamin oksidoreduktaza (HAO) pretvara hidroksilamin u nitrit ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$), a navedeni enzim kodira gen *hao*.

Gen *nxB* kodira β podjedinicu nitrit oksidoreduktaze (NXR), ključnog enzima za oksidaciju nitrita u drugom koraku nitrifikacije te predstavlja funkcionalni i filogenetski marker za identifikaciju metabolički raznovrsnih NOB (Pester i sur., 2012). Navedeni gen pronađen je u raznim staništima kod većine predstavnika roda *Nitrospira*, ali i kod *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrotoga*, *Nitrospina*, *Nitrolancea* i *Candidatus Nitromaritima* (Slika 3) (Hou i sur., 2018). Isto tako, gen *nxA* kodira α podjedinicu NXR koja se češće koristi za identifikaciju roda *Nitrobacter* i *Nitrococcus*, ali i različitih vrsta roda *Nitrospira*, iako dodjeljivanje *nxA* sekvenci određenim svojstama *Nitrospira* nije još do kraja procijenjeno te se takvi rezultati trebaju uzimati s oprezom (Lücker i sur., 2010; Daims i sur., 2015).

Comammox *Candidatus Nitrospira inopinata* (*Ca. N. inopinata*, in.o.pi.na'ta – neočekivano, iznenađujuće) se razlikuje po niskoj identičnosti nukleotida od druge dvije poznate comammox vrste *Candidatus Nitrospira nitrosa* i *Candidatus Nitrospira nitrificans* (van Kessel i sur., 2015; Daims i sur., 2015). NOB *Nitrospira* posjeduju dvije do pet paralognih

kopija gena *nxA* i *nxB*, dok *Ca. N. inopinata* ima samo jednu kopiju navedenih gena za oksidaciju NO_2^- . S druge strane, *Ca. N. inopinata* posjeduje homologe karakterističnih enzima bitnih za oksidaciju NH_4^+ poput AMO i HAO. Za razliku od redoslijeda gena *amoCAB* kao u AOM, *Ca. N. inopinata* posjeduje novi tip *amoA* gena koji pripadaju u posebnu *amoA* klasu A i *amoA* klasu B unutar loze II, a služe kao njihov filogenetski marker. „Comammox“ *amoA* geni ne mogu se detektirati s klasičnim PCR početnicama za AOM *amoA* gene. Jedini *hao* gen kojeg posjeduje ovaj comammox organizam kodira proteinski kompleks citokrom C koji u konačnici nalikuje na istoimene komplekse pronađene u svim AOM. Slično kao *amoA*, geni *amoB* i *amoC*, kao i *hao*, spadaju u različite klase povezane s odgovarajućim homolozima AOM te međusobno dijele zajedničkog pretka. Prisutnost novih tipova AMO i HAO u comammox organizmima koji dijele zajedničko podrijetlo s istoimenim enzimima predstavnika AOM i NOB, ukazuje na modularnu evoluciju dušikovog ciklusa i daje mu dodatnu složenost u procesu nitrifikacije (Daims i sur., 2015; Stein i Klotz, 2016; Pjevac i sur., 2017; Myrold, 2021).

2.3.2. Denitrifikacija

Denitrifikacija je proces redukcije NO_2^- preko intermedijera poput dušikovog oksida (NO) i didušikovog oksida (N_2O) u molekularni dušik u anoksičnim uvjetima ($(\text{NO}_3^- \rightarrow) \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) (Slika 2, reakcija 6A – D). Mikroorganizmi koji mogu izvršiti sve tri reakcije denitrifikacije s dodatnom redukcijom NO_3^- u NO_2^- nazivaju se klasičnim denitrifikatorima. Ipak, većina kemolitotrofnih bakterija i arheja sadržava samo neke gene (*nar*, *nir*, *nor*, *nos*) koji kodiraju enzime uključene u reakcije 5, 6A, 6B i/ili 6C (Slika 2). Stoga, često takvi nepotpuni metabolički putevi mogu dovesti do ispuštanja dušikovih stakleničkih plinova direktno u atmosferu i okoliš, kao što su NO i N_2O ili do neuspjeha u iscrpljivanju NO_3^- prisutnog u okolišu u velikim koncentracijama. Enzimi uključeni u reakcije denitrifikacije su reduktaze sa pripadajućim supstratima: NO_3^- , NO_2^- , NO i N_2O .

Najčešći predstavnici denitrifikatora su vrste roda *Pseudomonas*, *Achromobacter* i *Serratia* te poznati predstavnici poput *Thiobacillus denitrificans* i *Micrococcus denitrificans*. Isto tako, dokazano je da nekoliko eukariota uključujući gljive i krednjake (foraminifere) mogu reducirati NO_2^- ili NO_3^- u NO/ N_2O odnosno N_2 (Stein i Klotz, 2016).

2.4. Pregled metoda primjenjivih u istraživanjima mikrobne ekologije

Istraživanje mikrobne raznolikosti u slatkovodnim i morskim sustavima, kao i ekstremnim staništima poput geotermalnih voda, izravno je povezano s upotrebom različitih

molekularnih metoda. Razvoj ovih metoda omogućuje detaljan uvid u sastav, raznolikost i formiranje strukture mikrobnih zajednica prisutnih u različitim tipovima okoliša. Budući da metodama ovisnim o uzgoju nije bilo moguće opisati biološku raznolikost cjelokupne zajednice, pronađeni su alternativni načini identifikacije mikrobnih zajednica koje omogućuju izdvajanje pojedinačnih stanica ili one kojima uspješno možemo kvantificirati i karakterizirati raznolikost i metaboličke funkcije mikroorganizama u okolišu.

2.4.1. Molekularne metode

2.4.1.1. Izolacija i kvantifikacija okolišne DNA

Izolacijom okolišne DNA (eDNA, engl. *environmental DNA*) odnosno izolacijom DNA izravno iz organizama prikupljenih u okolišu, umnažanjem gena od interesa (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*, engl. prijevod: lančana reakcija polimerazom) te sekvenciranjem omogućena je identifikacija organizama koji su dotad bili nepoznati (Slika 4). Drugim riječima, to je proces koji je omogućio zaobilazanje tradicionalne identifikacije temeljene na uzgajanju čiste kulture. Mikroorganizmi su se počeli klasificirati na temelju sličnosti molekula poput ribosomalne RNA. Takav proces prvi put se koristio za gen 16S rRNA koji je i danas ostao najprimjenjeniji marker u identifikaciji strukture prokariotske zajednice. Koristi se zbog njegove univerzalne prisutnosti u svim prokariotskim mikroorganizmima i dovoljne konzerviranosti koja omogućuje usporedbe sličnosti i razlika između svih skupina prokariota (Fuhrman i Hagström, 2008). Slična situacija odnosi se na identifikaciju strukture eukariotske zajednice preko univerzalnog 18S rRNA gena ili na ITS regiju koja je vezana za identifikaciju gljiva. Na taj način, razvojem metoda sekvenciranja određenog gena ili određene regije gena, omogućen je detaljniji uvid u prokariotsku i eukariotsku bioraznolikost. Osim toga, sve bržim usavršavanjem tehnika sekvenciranja danas su omogućene analize sve većeg broja okolišnih uzoraka u što kraćem vremenskom periodu s tisućama očitavanja (engl. *reads*) po uzorku, kao i analize cjelokupnog genoma koji daju uvid u funkcionalne uloge i metabolizam zajednice (Karst i sur., 2016).

Za kvantificiranje DNA moguće je koristiti osjetljiviju metodu poput kvantitativnog PCR (qPCR, engl. *quantitative PCR*) u stvarnom vremenu. Ova tehnika je dorada klasične PCR metode te se koristi za procjenu ukupne brojnosti primjerice svih bakterija i arheja pomoću specifičnih početnica (Matsuda i sur., 2007). Isto tako, qPCR metoda dozvoljava procjenu brojnosti mikroorganizama koji pripadaju specifičnim funkcionalnim skupinama poput

nitriфиканата uz pomoć početnica koji ciljaju ključne funkcionalne gene kao što su u slučaju nitriфиканата *amoA*, *nxA* i *nxB* geni (Ge i sur., 2015).

Nadalje, određivanje strukture zajednice provodi se metodama poput DGGE i TGGE (engl. *Denaturing/Temperature Gradient Gel Electrophoresis*, engl. prijevod: elektroforeza u gelu s denaturirajućim/temperaturnim gradijentom) (Muyzer, 1999) te T-RFLP (engl. *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, engl. prijevod: Polimorfizam duljine krajnjih restrikcijskih fragmenata) (Dunbar i sur., 2000) i FISH metodom (engl. *Fluorescence In Situ Hybridization*, engl. prijevod: fluorescentna *in situ* hibridizacija) (Hu i sur., 2014). Sve navedene metode zahtijevaju početni korak izolacije okolišne DNA, dok je u slučaju FISH metode potrebno fiksiranje mikrobnih stanica i filtracija uzoraka kroz filter određene veličine pora (Hu i sur., 2014). U konačnici, metode poput qPCR, FISH, DGGE i T-RFLP ne dozvoljavaju detaljniju identifikaciju pojedinih svojti unutar mikrobne zajednice, već samo posrednu usporedbu sastava zajednice.

2.4.1.2. Metoda nove generacije sekvenciranja - Sekvenciranje amplikona

Zadnjih nekoliko godina došlo je do razvoja metoda nove generacije sekvenciranja koje omogućuju dobivanje velikog broja nukleotidnih sljedova istovremenim sekvenciranjem više uzoraka te posljedično popunjavanje baza podataka (Karst i sur., 2016). Osim detaljnijeg određivanja organizama koji se nalaze u okolišu, dobije se i uvid u njihovu zastupljenost. Međutim, sekvenciranjem nove generacije potrebno je ograničiti se na određenu regiju gena. Primjerice, 16S rRNA molekula sadržava 9 varijabilnih regija označenih kao V1 – V9 (Van den Peer, 1996). Budući da NGS-om nije moguće dobiti cjelokupni nukleotidni slijed gena za 16S rRNA, najčešće se koriste V3 i V4 regija za identifikaciju zajednice bakterija i arheja u staništu od interesa (Albertsen i sur., 2015). Takav pristup koji je omogućio napredak u sekvenciranju identifikacijom bakterija i arheja te čitanjem njihovog 16S rRNA gena poput korištenja „otisaka prstiju“ naziva se sekvenciranje amplikona 16S rRNA. Ista stvar je i sa sekvenciranjem amplikona 18S rRNA koji se odnosi na identifikaciju eukariota. Prije sekvenciranja amplikona, ciljani fragment DNA potrebno je umnožiti PCR metodom s ciljem kloniranja gena od interesa pomoću termostabilnog enzima polimeraze te posljedičnim dobivanjem dovoljnog materijala za analizu (Slika 4). Konačni produkt nakon PCR metode je zbirka sekvenciranja amplikona 16S rRNA/18S rRNA. Nakon pripreme zbirke amplikona 16S rRNA/18S rRNA, slijedi korak sekvenciranja DNA za koji postoji više različitih strategija, a

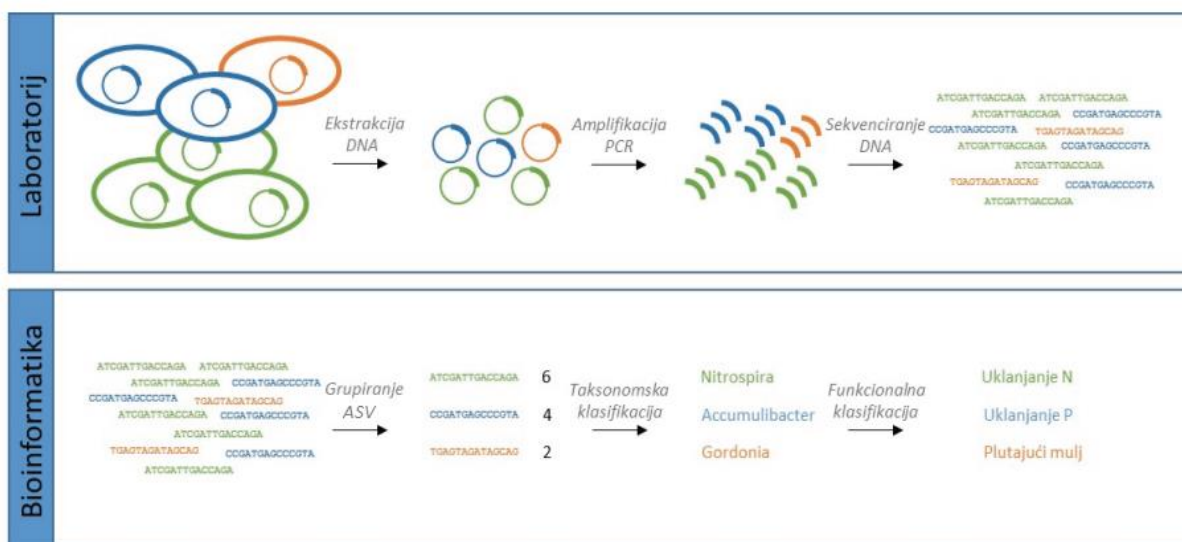
najprikladnijom se pokazala metoda platforme Illumina MiSeq. Ova metoda u jednom sekvenciranju u trajanju od 56 h omogućuje analizu 50 000 očitavanja po uzorku te sekvenciranje 301 bp sa svakog kraja amplikona koji se tijekom obrade podataka spajaju do maksimalne dužine od 550 bp (engl. *paired-end sequencing*, eng. prijevod: sekvenciranje uparenih krajeva) (Albertsen i sur., 2015; Karst i sur., 2016).

Zbog mogućeg dobivanja veće količine podataka poput nekoliko tisuća do nekoliko stotina tisuća nukleotidnih slijedova po uzorku, za obradu sirovih sekvenci potrebno je koristiti softverske programe poput QIIME (Caporaso i sur., 2010), Mothur (Schloss i sur., 2009), SILVAngs i UPARSE (Edgar, 2013). Ovi programi koriste neku od baza podataka sa 16S rRNA nukleotidnim slijedovima za taksonomsku klasifikaciju poput SILVA (Quast i sur., 2013), MiDAS (McIlroy i sur., 2015), Greengenes (McDonald i sur., 2012) ili RDP (Cole i sur., 2014). Za dodjelu taksonomije 18S rRNA nukleotidnim slijedovima koriste se baze poput PR² (Guillou i sur., 2013), SILVA (Quast i sur., 2013) ili RDP (Cole i sur., 2014). Nakon bioinformatičke obrade konačni rezultat je tablica varijanta sekvence amplikona (ASV, engl. *amplicon sequence variant*). Svaki ASV ima dodijeljenu taksonomsku pripadnost i brojnu vrijednost (zastupljenost) u određenom uzorku.

U zadnjem koraku, statističkoj analizi podataka u programskom jeziku poput R-a (R Core Team, 2021), konačnom usporedbom pripadnika identificirane mikrobne zajednice, njihovom kvantifikacijom u ukupnoj zajednici i utjecajem izmjerenih okolišnih čimbenika preko raznih multivarijatnih statističkih analiza i matematičkih modela uzročnosti (engl. *causality models*) te usporedbom s literaturom, moguće je donijeti zaključke o strukturi proučavanih zajednica, kao i o mogućim funkcionalnim ulogama pronađenih skupina (Slika 4).

Odabir statističkih metoda za obradu podataka mikrobnih zajednica ovisi o specifičnim ciljevima istraživanja, prirodi i karakteristikama podataka koje posjedujemo uključujući vrstu varijabli, raspodjelu podataka i prirodu veza između varijabli. Alfa raznolikost poput Shannonovog i Simpsonovog indeksa raznolikosti, kao i Chao1, pruža važne informacije o mikrobnoj zajednici poput brojnosti različitih vrsta i heterogenosti ekosustava. Statističke metode poput PERMANOVA (engl. *Permutational analysis of variance*, eng. prijevod: Permutacijska multivarijatna analiza varijance) i ANOVA (engl. *Analysis of variance*, eng. prijevod: Analiza varijance) mogu se koristiti za testiranje statističke značajnosti između uzoraka, a parametarski i neparametarski „*post hoc*“ statistički testovi, koji se odabiru ovisno o potrebama analize, koriste se za otkrivanje specifičnih razlika među grupama. Multivarijatne analize poput PCoA (engl. *Principal coordinate analysis*, eng. prijevod: Analiza glavnih koordinata) i PCA (engl. *Principal component analysis*, eng. prijevod: Analiza glavnih

komponenti) koriste se za vizualizaciju i razumijevanje prostornog rasporeda te varijabilnosti među podacima. Testovi korelacije, bazirani na Pearsonovom i Spearmanovom koeficijentu, koriste se za mjerenje povezanosti između testiranih varijabli ovisno o distribuciji podataka i vrsti veze. Pažljiv odabir odgovarajućih statističkih metoda i testova ključan je za dobivanje pouzdanih rezultata i preciznih tumačenja o mikrobnj zajednici.



Slika 4. Osnovni koraci u mikrobnj ekologiji pomoću sekvenciranja amplicona 16S rRNA (preuzeto i prilagođeno prema: Karst i sur., 2016).

Ipak, za što točnije prikupljanje informacija o raznolikosti metaboličkog i funkcionalnog kapaciteta mikrobne zajednice potrebno je baviti se cjelokupnim genomom, odnosno metagenomikom (Su i sur., 2012). U metatranskriptomici, detaljnim proučavanjem okolišne mRNA dobiva se najtočnija informacija o genskoj ekspresiji *in situ* (Poretski i sur., 2009; Simon i Daniel, 2011), a najpreciznijom metodom za mjerenje metaboličke aktivnosti proučavanjem raznolikosti i učestalosti različitih prisutnih proteina u zajednici smatra se metaproteomika (Schenier i Riedel, 2010), koja ima veliki potencijal kao buduća glavna metoda za analizu raznolikosti i aktivnosti mikrobne zajednice pri definiranju funkcija ekosustava, kao i za njihove moguće promjene.

2.4.2. Metode temeljene na uzgoju

U prošlosti se smatralo kako je moguće uzgojiti sve bakterije i arheje prisutne u okolišu manipulacijom fizikalno-kemijskih uvjeta u laboratoriju i prilagođavanjem sastava podloga, odnosno metodama kultivacije. Na taj način, omogućujući mikroorganizmima razmnožavanje

u kontroliranom okruženju za rast (mediju) i pod kontroliranim laboratorijskim uvjetima dolazi do porasta kultura. Ako kultura sadržava populacije različitih mikroorganizama smatra se mješovitom kulturom, dok se prisutnost samo jedne vrste mikroorganizama definira kao čista kultura. Uzgoj čiste kulture je konačni cilj cijelog procesa kako bi se proučila fiziologija i moguće funkcije određene vrste od interesa. Prva istraživanja prokariotskih zajednica, koja datiraju iz 19. stoljeća, bazirala su se na uzgajanje čiste kulture gdje je uzgoj određene vrste u kulturi bio potreban korak identifikacije prokariota (Fuhrman i Hagström, 2008).

Mikroorganizmi se mogu uzgajati na tri vrste medija: tekućim, čvrstim i polučvrstim, koje imitiraju okruženje slično prirodnom staništu mikroorganizama od interesa (sa sličnim kemijskim sastavom). Osim toga, mediji moraju biti sterilni, odnosno bez prisutnog oblika života na mediju prije naciepljivanja mikroorganizama (korak inokulacije) kako bi se izbjegle mikrobiološke kontaminacije hranjivih podloga (Lagier i sur., 2015). Tekući mediji ili „bujoni“ ne sadržavaju agar, a rast mikroorganizama može se pratiti preko „opće zamućenosti“ spektrofotometrijski i turbidimetrijski. Čvrsti mediji obično se pripremaju kao agar ploče u prozirnim staklenim ili plastičnim cilindarskim zdjelicama (tzv. Petrijeve zdjelice). Medij za rast sastoji se od nerazgranatog polisaharida agara (u koncentraciji od 2 % do 4 %) koji omogućuje skrutnjavanje te hranjivih tvari potrebnih za uzgoj mikroorganizama. Osim što se topi na 95 °C i stvrdnjava na 42 °C, agar ne pridonosi nikakvim hranjivim svojstvima te ne sadrži tvari koje bi mogle pospješiti ili inhibirati rast mikroorganizama. Polučvrsti mediji, poput Hugh-Leifson medija, manje se koriste, ali su korisni za demonstraciju pokretljivosti mikroorganizama. Oni se dobivaju smanjenjem koncentracije agara na 0,2 % do 0,5 % (Chauhan i Jindal, 2020).

Osim prema konzistenciji, mediji se dijele prema nutritivnoj komponenti na jednostavne, složene i sintetičke (kemijski definirane) medije, pri čemu se sintetički mediji posebno koriste u istraživačke svrhe. Svaka komponenta sintetičkog medija dobro je poznata te pripremljena od kemijski čistih tvari kako bi se omogućio uzgoj čistih kultura u aseptičnim uvjetima.

Za uzgoj mikroorganizama iz okoliša, najčešće se koriste tekuće hranjive podloge sastavljene od makro- i mikronutrijenata. Ovisno o koncentraciji ($> 10^{-4}$ M), makronutrijentima najčešće pripadaju C, N, H, O, S, P, Mg^{2+} i K^{+} , dok su mikronutrijenti ($< 10^{-4}$ M) Fe^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} , Cu^{2+} , Na^{+} te određeni vitamini i metabolički prekursori. Nutrijenti su potrebni za sintezu staničnog materijala i energije, kao i za sintezu proizvoda metabolizma. Mikroorganizme prema izvoru ugljika i energije možemo podijeliti na fotoautotrofe, kemoautotrofe, ftoheterotrofe i kemoheterotrofe (Tablica 2). Većina industrijskih

mikroorganizama pripada kemoheterotrofima koji dobivaju energiju aerobnom respiracijom, fermentacijom ili anaerobnom respiracijom. Stoga, izvor ugljika, koji je najbitniji element pri izgradnji staničnih struktura, u procesima kultivacije može biti anorganska ili organska tvar, ovisno o vrsti mikroorganizma i metabolizmu stanice (Ivančić Šantek, 2020).

Osim kemijskih čimbenika poput sastava hranjive podloge i odgovarajuće pH vrijednosti, za uspješan uzgoj mikroorganizama u kulturama potrebno je osigurati optimalne fizikalne uvjete. Ovi fizikalni čimbenici uključuju temperaturu, aktivitet vode, osmotski tlak podloge i svjetlost ukoliko je potrebna. Proces kultivacije mikroorganizama nije jednostavan, što je ilustrirano činjenicom da tek nekolicina od 40 poznatih prokariotskih koljena ima uzgojene predstavnike, a što ujedno sugerira da je 99 % mikroorganizama prisutnih u okolišu nemoguće uzgojiti standardnim metodama kultivacije (Su i sur., 2012). Slično se može reći i za kultivaciju protista (eukariota), koji su općenito manje istraživani u usporedbi s prokariotima. Poznavanje raznolikosti protista temeljilo se na vrlo malom broju uzgojenih sojeva i proučenoj fiziologiji. Međutim, razvoj molekularnih metoda i različitih načina sekvenciranja omogućio je otkrivanje novih vrsta protista, od kojih većina još uvijek nije uspješno kultivirana (del Campo i sur., 2013). Ove činjenice naglašavaju složenost procesa kultivacije mikroorganizama i potrebu za naprednijim metodama istraživanja, kao što je meta-genomika, transkriptomika ili proteomika i ostale metode koje omogućuju proučavanje mikroorganizama iz okoliša u njihovim prirodnim staništima, bez potrebe za uzgojem u laboratorijskim uvjetima.

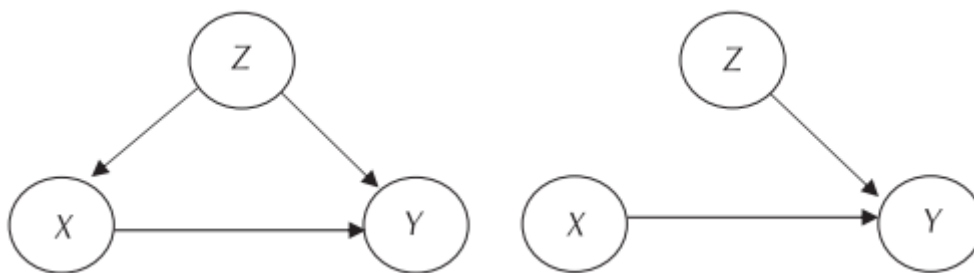
Tablica 2. Podjela mikroorganizama prema izvorima energije i ugljika (preuzeto i prilagođeno prema: Ivančić Šantek, 2020).

| | Fotoautotrofi | Kemoautotrofi | Fotoheterotrofi | Kemoheterotrofi |
|-----------------------|---|---|--|--|
| Izvor ugljika | CO ₂ | CO ₂ | Organske tvari | Organske tvari |
| Izvor energije | Svjetlost | Oksidacija anorganskih tvari (H ₂ S, NH ₄ ⁺ , Fe ²⁺) | Svjetlost | Oksidacija organskih tvari |
| Mikrobi | Fotosintetski prokarioti (cijanobakterije), neki protisti (mikroalge) | Neki prokarioti (npr. <i>Sulfolobus</i>) | Neki prokarioti (<i>Rhodobacter</i> , <i>Chloroflexus</i>) | Mnogi prokarioti (<i>Clostridium</i>) i protisti |

2.4.3. Matematički modeli uzročnosti

Umjetna inteligencija (AI) veoma je bitna za primjenu i analizu velike količine podatka u područjima društvenih, prirodnih i tehničkih znanosti, a očekuje se da će uskoro utjecati sve više na područja kao što su medicina, agronomija, ekonomija i neke druge društvene znanosti (Jordan i Mitchell, 2015; Kurtanjek, 2021; Pichler i Hartig, 2023). Ova metodologija u području računalnih znanosti razvijena je tijekom posljednjih 20 godina. Teorijska osnova je matematički složena, no stalnim razvojem digitalizacije i podatkovne znanosti omogućilo se stvaranje Microsoft programske podrške naziva DoWhy (Sharma i Kiciman, 2021) s primjenom, stimulacijom i razvojem modela te u konačnici grafičkim prikazom kauzalnih dijagrama.

Kauzalnost se može primijeniti u smislu modeliranja različitih uzroka koji putem različitih kauzalnih mehanizama, imaju mnogo različitih učinaka (Baciu, 2023). Drugim riječima, pojam kauzalnosti definira se kao mjera uzroka kojom varijable X i Z utječu na varijablu Y (Slika 5) te isto tako kako promjene varijabli X i Z mogu biti uzrokom promjene varijable Y . Kauzalnost ne predstavlja statistički pojam, već se primjenjuje isključivo logičko statističko zaključivanje za određivanje mjere utjecaja. Isto tako, kauzalnost nije reverzibilna i implicira na pretpostavke temeljno različite od korelacija, dok je statistička korelacija između X i Y ili Z i Y reverzibilna (Kurtanjek, 2021). U konačnici, kauzalnost se procjenjuje statistički iz izmjerenih podataka s promjenjivim uvjetima jer onaj sustav koji se analizira često nije moguće održavati u potpuno kontroliranim uvjetima. U praksi, istraživani sustavi su složeni s velikim brojem varijabli od kojih često mnogo njih nije poznato i/ili mjereno, a razdiobe gustoće vjerojatnosti nisu Gaussove ili nisu uopće poznate (Hitchcock, 2018; Kurtanjek, 2022).



Slika 5. Usmjereni neciklički graf (DAG) za određivanje kauzalnosti Y pod utjecajem varijabli Z i X (preuzeto i prilagođeno prema: Kurtanjek, 2021).

Obično se koriste prediktivni nelinearni AI modeli kao što su duboke neuronske mreže i stabla odlučivanja. Oni su moćni prediktori, ali nemaju transparentnost i koriste se kao modeli

"crne kutije" (engl. *black box*) (Ribeiro i sur., 2016; Kurtanjek, 2021; Rezić, 2022). Koriste se analitičkim funkcijama poput $y = f(\beta; x) + n$, gdje n predstavlja slučajnu pogrešku modela i podataka, a β jesu parametri modela (Kurtanjek, 2021).

S druge strane, za određivanje postojanja kauzalne veze češće se koriste matematički modeli s Bayesovim mrežama. Matematički modeli su vrlo složeni i prikazuju brojne varijable, stoga se ovaj alternativni model temelji na strukturalnoj mreži predstavljenoj kao usmjereni neciklički/aciklički graf (DAG, engl. *directed acyclic graph*) (Diemer i sur., 2021; Kurtanjek, 2021; Rezić i sur., 2022, Arif i Macneil, 2022). U slučaju ovog strukturalnog kauzalnog modela, pojedine varijable prikazane su kao čvorovi grafa (kružići), dok je smjer poveznice orijentiran od uzroka prema posljedici (strelice) (Slika 5), a međusobne poveznice predstavljaju bridovi koji ukazuju na pripadnu statističku povezanost (Kurtanjek, 2021; Baciu, 2023; Runge, 2023). Isto tako, mogući je utjecaj jedne interferirajuće varijable (Z) istodobno na više drugih varijabli (na uzrok X i posljedicu Y) (Slika 5). Zbog statističke povezanosti između varijabli Z i X dolazi do stvaranja povratne nekauzalne asocijacije što bitno utječe na konačnu procjenu i često ima za posljedicu pristrane zaključke (Diemer i sur., 2021; Kurtanjek, 2021). Osnova ocjenjivanja razdiobe vjerojatnosti varijabli u složenim DAG mrežama s puno parametara je Markovljevo svojstvo gdje je navedena razdioba zavisna o razdiobama roditeljskih varijabli. Drugim riječima, određena varijabla kauzalno je određena s jednom ili više roditeljskih varijabli (Kurtanjek, 2022). Ono što se mora uzeti u obzir je da statistička procjena β u složenim sustavima, u bilo kojem tipu modela, može biti podložna pristranosti i velikim pogreškama (Kurtanjek, 2021).

2.4.3.1. Primjena modela uzročnosti u mikrobnjoj ekologiji

Prikupljanje, obrada i interpretacija podataka ključni su za ekološka istraživanja i za praćenje biološke raznolikosti. Ove nove metode omogućuju bržu i preciznu analizu podataka s različitih senzora i kamera, a algoritmi dubokog učenja mogu automatski prepoznati, prebrojati i klasificirati vrste na temelju digitalnih slika i videa. Za izradu prediktivnih modela putem matematičkih modela kauzalnosti potreban je velik broj podataka i dugoročno praćenje sustava, kao što je napravljeno na primjeru sjevernog Jadrana koji se neprestano istražuje već dugi niz godina (1965. – 2015.). U ovom slučaju, predikcije modela ukazale su na moguće povećanje temperature čak do 6 °C te porast razine mora do 40 cm što upozorava na ozbiljne posljedice u budućnosti (Kurtanjek, 2022). Osim planktona, ostala dosadašnja istraživanja uključuju primjere modela u analizi riba, različitog onečišćenja i ciklusa nutrijenata (Solvang i Subbey, 2019; Goodwin i sur., 2022).

U mikrobnjoj ekologiji, primjer observacijskog kauzalnog istraživanja započeo bi prikupljanjem informacija o produktivnosti ekosustava, uključujući brojnost i raznolikost vrsta (biotički faktori) i fizikalno-kemijska svojstva staništa (abiotički faktori). Na temelju tih informacija, pomoću kauzalnog grafa (DAG) mogle bi se otkriti izravne uzročne veze bioraznolikosti i produktivnosti ekosustava koje su uzrokovane mnogim čimbenicima. Ovo se razlikuje od jednostavnih mjera korelacije koje mogu sugerirati samo djelomično na kauzalni učinak bioraznolikosti na produktivnost. U tom smislu, modeli kauzalnosti mogu donijeti određene prednosti u odnosu na eksperimente koji su često skupi i potencijalno neetični. Osim toga, mogu pridonijeti lakšem odabiru uvjeta uzgoja u postupku kultivacije te ponekad pružiti korisne informacije jer se eksperimentalni zaključci ne mogu baš uvijek generalizirati na prirodne ekosustave (Runge, 2023).

2.5. Biotehnološka primjena termofila

Zahvaljujući kontinuiranim istraživanjima znanstvenika, ekstremofilni mikroorganizmi, posebice termofili, postali su iznimno vrijedni u različitim biotehnološkim područjima. Posebno su značajni jer mogu obavljati biotehnološke procese pri iznimno visokim temperaturama koje nisu podnošljive za mezofile, mikroorganizme koji preferiraju umjerene temperature. Njihova sposobnost aktivnosti i stabilnosti enzima pri povišenim temperaturama čini ih izuzetno korisnima za razgradnju složenih organskih spojeva i biootpada (Cai i sur., 2020), u tehnologiji obrade vode (bioremedijacija), gdje su primijenjeni za uklanjanje štetnih tvari iz vodnih sustava (Muter, 2023) te u procesima biološke kontrole pri suzbijanju štetnih organizama u poljoprivredi (Mehetre i sur., 2021). Isto tako, njihova sposobnost proizvodnje metabolita i enzima, poput amilaza, celulaza, esteraza/lipaza, lakaza, proteaza i superoksid dismutaza, korisnih u farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim tipovima industrije pridonosi njihovoj važnosti (Singh, 2011; Sharma i sur., 2012; Atalah i sur., 2019; Bala i Singh, 2019).

2.5.1. Obrada otpadnih voda

Brza industrijalizacija, intenzivna poljoprivreda i urbanizacija dovode do sve češćeg stvaranja voda koje sadrže nepoželjne koncentracije onečišćujućih tvari. Otpadnim vodama se smatraju sve vode sa promijenjenim biološkim, kemijskim ili fizikalnim svojstvima zbog unosa onečišćenih tvari poput nitrata, fosfata, olova, žive, arsena, kadmija, detergenata, boja, organskih tvari, pesticida, policikličkih aromatskih ugljikovodika, poliklorbifenila i hlapivih organskih spojeva. Takve vode nastaju kao produkt poljoprivrednih aktivnosti, površinskog

otjecanja te aktivnosti iz industrije ili kućanstva. Primjerice, nakupljanje spojeva poput dušika i fosfora može utjecati na porast algi i drugih vodenih biljaka, što za posljedicu ima smanjenje kisika te dovodi do ugibanja života u vodenim tijelima, a sami proces naziva se eutrofikacijom (Crini i Lichtfouse, 2018).

Jedna vrsta otpadnih voda su procjedne vode koje nastaju tijekom kompostiranja. Kompostiranje se ističe kao ekološki prihvatljiv i učinkovit postupak upravljanja biorazgradivim otpadom, koji transformira neupotrebljiv materijal u vrijedan kompost, a temelji se na kontroliranom aerobnom biološkom razlaganju organske tvari pri čemu nastaje humus – kompost. U samom procesu kompostiranja dolazi do povišenja temperature (USDA, 2010), a tijekom kompostiranja, posebice kada se govori o kompostiranju industrijskih razmjera, generiraju se značajne količine procjedne vode koje mogu sadržavati različite supstance s potencijalno štetnim učinkom na okoliš. Pri prirodnoj razgradnji procjednih voda ne dolazi do povišenja temperature, kao u samom procesu kompostiranja (He i sur., 2015; Mokhtarani i sur., 2015).

Pročišćivanje otpadnih voda je izuzetno važno zbog smanjenja organskih tvari prisutnih u okolišu. Proces pročišćivanja otpadnih voda sastoji se od 5 uzastopnih koraka od kojih svaki korak ima svoju svrhu obrade te uklanja specifična onečišćenja: 1) fizikalna (prethodna) obrada, 2) primarna (fizikalno-kemijska i kemijska) obrada, 3) sekundarna (kemijska i biološka) obrada, 4) završna tercijarna (fizikalna i kemijska) obrada i 4) obrada nastalog mulja. Obradene vode time postaju bezopasne za cijeli okoliš (Crini i Lichtfouse, 2018).

2.5.1.1. Sekundarna obrada otpadnih voda - bioremedijacija

Biološki postupci pročišćavanja otpadnih voda u anaerobnim ili aerobnim uvjetima, gdje se procesom biorazgradnje složeni organski spojevi transformiraju u jednostavnije spojeve uz djelovanje mikroorganizama naziva se bioremedijacijom. Dvije glavne metode bioremedijacije uključuju biostimulaciju i bioaugmentaciju. Biostimulacija uključuje podešavanje čimbenika okoline s ciljem aktivacije autohtonih mikroorganizama u sustavu na razgradnju onečišćujućih tvari te se smatra isplativom, ekološki prihvatljivom te najučinkovitijom tehnikom obrade. S druge strane, u slučaju da autohtone vrste nisu dovoljno brze ili sposobne za odvijanje procesa bioremedijacije, dodavanjem drugih specifičnih vrsta mikroorganizama, odnosno bioaugmentacijom, može se doprinijeti biorazgradnji složenih onečišćujućih tvari (Goswami i sur., 2018). U bioaugmentaciji najčešće se koriste bakterijske kulture bogate vrstama roda *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* i *Streptomonas*, a dodavanje identificiranih kultura u sustav naziva se visokospecifičnom bioaugmentacijom (Wang i sur.,

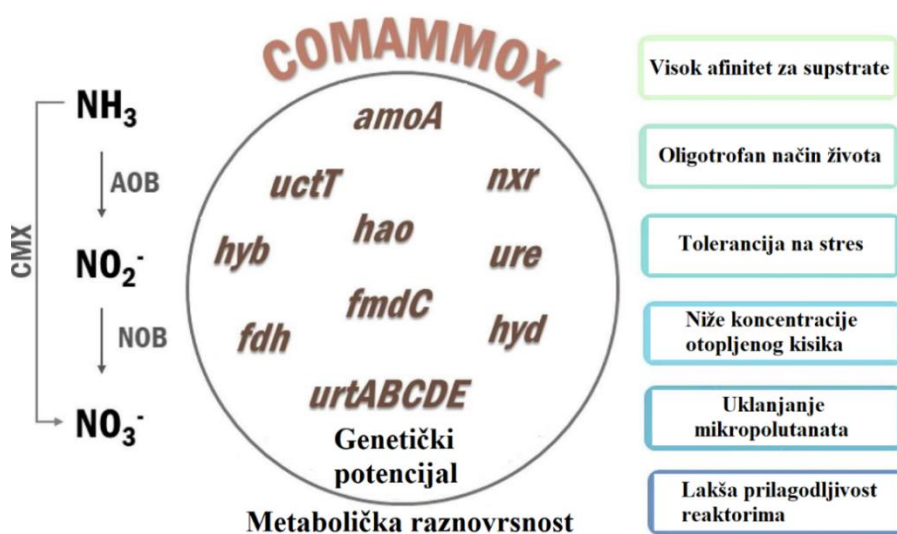
2009). Nespecifična bioaugmentacija podrazumijeva dodavanje kultura u sustav bez prethodne identifikacije. Dodane kulture mogu biti klasificirane kao autohtone ili egzogene. Autohtonim kulturama se smatraju mikroorganizmi izdvojeni iz onečišćenog tla ili voda, uzgojeni u optimalnim uvjetima te ponovno unešeni u zagađeno područje, dok egzogenim kulturama pripadaju mikroorganizmi izolirani iz drugog tipa staništa, uzgojeni u njima optimalnim uvjetima te potom unešeni u onečišćeni sustav (Wang i sur., 2009; Goswani i sur., 2018).

U procesima smanjenja koncentracije prisutne onečišćujuće tvari, ključnu ulogu imaju razne nitrificirajuće i denitrificirajuće bakterije i arheje za odvijanje istoimenih procesa (Holmes i sur., 2019), poput nitrifikanata AOM kojima pripadaju rodovi poput *Nitrosococcus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosopumilus*, ali i NOB poput *Nitrococcus*, *Nitrobacter*, *Nitrospira* i *Nitrospina* (Slika 3). Isto tako, osim što su korisne u proizvodnji biogoriva, mikroalge mogu poslužiti u bioremedijaciji uklanjajući višak nitrata i fosfata poput vrsta roda *Tribonema* (Cheng i sur., 2019; Wang i sur., 2019). S druge strane, denitrifikaciju u postrojenjima obavljaju rodovi poput *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Flavobacterium* i mnogi drugi (Rodriguez-Caballero i sur., 2013). Otkriće novog procesa kao što je potpuna nitrifikacija preko comammox organizama, s rodom *Nitrospira* kao jedinim predstavnikom, u usporedbi s klasičnom nitrifikacijom nosi mnoge industrijske prednosti. Tijekom bioremedijacije, odvijanje procesa potpune nitrifikacije rezultira manjom emisijom stakleničkih plinova. Comammox organizmi su ekonomičniji odabir jer su prilagodljiviji uvjetima poput stresa i nove životne okoline, niže koncentracije hranjivih tvari i kisika te su metabolički raznovrsniji za razliku od AOM i NOB (Slika 6) (Daims i sur., 2015, Koch i sur., 2018, Maddela i sur., 2022).

Termofili imaju brojne prednosti koje bi se mogle iskoristiti u procesima bioremedijacije. Zbog života u ekstremnim uvjetima koji je doveo do razvoja različitih strategija prilagodbe i tolerancije, termofili mogu ponuditi širok spektar novih uvjeta poput oksidacije i redukcije dušikovih i sumpornih spojeva, poboljšane solubilizacije metala i učinkovitu sposobnost razgradnje organske tvari pri visokim temperaturama te time unaprijediti dosadašnje procese bioremedijacije (Cai i sur., 2020; Danilova i Sharipova, 2020; Mir i sur., 2021).

U literaturi se termofilna obrada otpadnih voda obično odnosi na procese obrade pri temperaturama u rasponu od 45 do 70 °C. Međutim, postoje i termofili koji rastu pri nižim temperaturama, a često se nazivaju fakultativnim termofilima (< 50 °C). S obzirom na to da je za mezofilne bakterije koje se inače koriste u pročišćavanju otpadnih voda optimalan raspon temperature između 20 i 30 °C, ujedno i iz ekonomičnijih razloga, postavlja se zanimljivo pitanje: može li doći do barem male aktivnosti termofila pri nižim (mezofilnim) temperaturama obrade vode i u kojoj mjeri? Svakako, rast i aktivnost termofila i njihovih enzima se uspoređuju

pri nižim temperaturama. Iako su već uvelike proučene razlike, prednosti i nedostaci termofilnih i mezofilnih mikroorganizama, važno je istražiti mogućnost termofila da ipak doprinesu biološkoj obradi otpadnih voda pri uobičajenim mezofilnim temperaturama, koje se koriste u ekonomičnijim biotehnološkim procesima. Njihova iznimna prilagodljivost stresu i novim životnim uvjetima može im pružiti potencijalne prednosti u ovom kontekstu te stoga zaslužuju daljnju pažnju i istraživanje s ciljem održavanja ekonomičnosti i postizanja veće efikasnosti u navedenim procesima (Metcalf i Eddy, 2003).



Slika 6. Prednosti comammox organizama u procesima bioremedijacije (preuzeto i prilagođeno prema: Maddela i sur., 2022).

3. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje podijeljeno je u tri faze, od kojih je prva faza objavljena kao samostalni znanstveni rad (Mitrović i sur., 2022).

Prva i druga faza istraživanja uključuju identifikaciju mikrobne zajednice prokariota i eukariota korištenjem visoko-protodne metode sekvenciranja mikrobne DNA na 19 (prokarioti) odnosno 14 (eukarioti) najvažnijih geotermalnih lokaliteta, većinom smještenih u središnjoj i istočnoj Hrvatskoj. Prokariotska zajednica istraživala se tijekom tri sezone uzorkovanja u jesen 2019., proljeće 2020. i jesen 2020. godine, dok se eukariotska zajednica istraživala tijekom jeseni 2020. godine. Sezonsko *in situ* mjerenje parametara te različite laboratorijske metode korištene su za određivanje abiotičkih faktora koji utječu na oblikovanje strukture mikrobnih zajednica te za utvrđivanje postojanja prostorno-vremenskih razlika.

U trećoj fazi istraživanja provedene su metode prikladne za uzgoj prokariotskih ekstremofilnih mikroorganizama koji sudjeluju u procesu nitrifikacije kao što su amonij-oksidirajuće arheje (AOA), amonij-oksidirajuće bakterije (AOB), nitrit-oksidirajuće bakterije (NOB) i comammox organizmi (engl. *complete ammonia oxidizers*, engl. prijevod: potpuni oksidanti amonijaka). Na temelju prikupljenih rezultata u prvoj fazi istraživanja, odabrane su tri lokacije geotermalnih voda za analizu mikrobnih zajednica koji sudjeluju u ciklusu dušika. Također, u ovoj fazi istraživanja testirana je i mogućnost biološke obrade procjedne vode biootpada s uzgojenim kulturama kao jedna od mogućih biotehnoloških primjena mikroorganizama iz geotermalnih voda Hrvatske.

3.1. Područje istraživanja i uzorkovanje

Ukupno 19 geotermalnih lokaliteta (13 bušotina i 6 izvora) odabrano je za sezonsko prikupljanje uzoraka i terenska mjerenja. Odabrani lokaliteti većinom su smješteni u središnjoj i istočnoj Hrvatskoj te sjevernom dijelu primorske Hrvatske (Slika 7). Uzorci vode za analizu mikrobne zajednice prikupljeni su sa 13 različitih lokaliteta u jesen 2019., proljeće 2020. i jesen 2020. kako bi se istražila sezonska dinamika i stabilnost zajednice geotermalnih voda. Dodatnih 6 lokaliteta uzorkovani su samo u jesen 2019. i jesen 2020., budući da uzorkovanje u proljeće 2020. nije bilo moguće zbog epidemiološke situacije uzrokovane COVID-19 virusom. Prosječni prinos i dubina bušotina prikazani su u Prilogu 1, kao i vrsta trenutnog iskorištavanja uzorkovanih geotermalnih voda.



Slika 7. Položaj istraživanih geotermalnih voda s geološkim područjima Hrvatske, njihovim općim geotermalnim svojstvima i skupinom vodonosnika. Karta je generirana pomoću softvera QGIS 3.14.

Uzorkovani lokaliteti podijeljeni su u četiri skupine prema kombinaciji geografskog položaja i hidrokemijskim uvjetima te geološkim i hidrogeološkim svojstvima geotermalnih vodonosnika (Slika 7). Skupina 1 uključuje većinu geotermalnih lokaliteta - specijalnih bolnica smještenih u sjeverozapadnom i središnjem dijelu područja istraživanja: Jezerčica (JEZ), Krapinske toplice (KRA), Svetojanske toplice (SJA), Stubičke toplice (STU), Topusko (TOP), Tuheljske toplice (TUH) i Varaždinske toplice (VAR). U Skupinu 2 spadaju Toplice sveti Martin (SVM) koje se nalaze na području Međimurja i lokaliteti smješteni u Zagrebu: Mladost (ZGM) i Blato (ZGB). Skupina 3 sadržava izvore Antunovo vrelo (AVD), Ivanovo vrelo (IVD)

i bušotinu Marijino vrelo (D1D) koje pripadaju Daruvarskim toplicama smještenih unutar Julijevo parka te bušotinu iz Lipičkih toplica (LIP). Ove toplice, međusobno udaljene manje od 30 km, specijalne su bolnice, smještene između Ilovske depresije i zapadnih obronaka Papuka. U Skupini 4 zastupljeni su lokaliteti iz istočnog dijela istraživanog područja: Bizovačke toplice (BIZ), poznate terme smještene u Osječko-baranjskoj županiji i bušotina Bošnjaci (BOS) čija se termalna voda iskorištava za grijanje staklenika i hidroponski uzgoj tvrtke RURIS d.o.o., vodećeg proizvođača rajčica. Tri uzorkovana geotermalna lokaliteta nisu svrstani u nijednu gore spomenutu skupinu vodonosnika, a to su Đakovačka Breznica (DAB), Krečaves (KRE) te Istarske toplice (IST) koje su u statističkim analizama tretirane kao pojedinačni uzorci. Đakovačka Breznica naselje je smješteno na sjevernim padinama Dilja u Slavoniji, 22 km zapadno od grada Đakova (Slika 7) koje sadržava relativno hladnu vodu obogaćenu sumpornim spojevima. Preostala dva lokaliteta IST i KRE također su obogaćena sumporom, pri čemu se IST nalazi u sjevernom dijelu primorske Hrvatske, dok se KRE nalaze 25 km sjeverno od Zagreba u istoimenom selu Krečaves. Bušotina uzorka KRE, poznatija u narodu kao terme Jokobanja, nalazi se na mjestu okruženom poljoprivredno obradivim područjima.

Uzorci vode prikupljeni su u sterilne PET boce za analizu mikrobne zajednice i sterilne polikarbonatne (PC) boce za karakterizaciju kemijskih parametara. Budući da su sve bušotine bile u aktivnoj upotrebi (Prilog 1), voda je uzorkovana iz ventila na glavi svake bušotine, dok su izvori uzorkovani izravno s mjesta gdje voda istječe iz podzemlja. Za analizu mikrobne zajednice, ukupno 51 uzorak vode filtriran je peristaltičkom pumpom (Master flex L/S pumpa i kontrolor brzine, 6-600 rpm, 180 VDC, 0,1 HP model 07559/07, Cole-Parmer) na polikarbonatni filter veličine pora 0,22 μm (Whatman Nuclepore Track-Etch membrana, promjer 47 mm, Njemačka) do zasićenja (volumen naveden u Prilogu 1), a filteri su pohranjeni na temperaturi od - 80 °C do daljnje obrade.

3.2. Mjerenje i određivanje abiotičkih parametara

Prije uzorkovanja, pomoću multi-parametarske WTW sonde (tvrtka WTW, Njemačka) mjereni su *in situ* sljedeći fizikalni parametri: električna vodljivost (EC, engl. *electrical conductivity*) s preciznošću $\pm 1\mu\text{S}/\text{cm}$, otopljeni kisik u vodi (O_2) s preciznošću $\pm 0,1\text{ mg/L}$, pH vrijednost s preciznošću $\pm 0,01$ i temperatura vode (°C) s preciznošću $\pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$. Isto tako, na terenu su izmjerene koncentracije sumporovodika (H_2S) u vodi koristeći reagense sulfida 1 i 2 prema kolorimetrijskoj USEPA metilen-modro metodi pomoću spektrometra (HACH DR3900, Colorado, SAD), kako je navedeno u DR priručniku 1 (<https://www.hach.com/assetget.preuzimanje.jsa?id=7639983902>). Otopljene koncentracije

kationa (Na^+ , NH_4^+) te aniona (Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-}) mjerene su ionskom kromatografijom (Dionex ICS-6000 DC, Kalifornija, SAD). Koncentracije silicija kao SiO_2 izmjerene su kolorimetrijskom metodom na spektrometru (tvrtka HACH DR3900, Colorado, SAD) prema DR priručniku 2 (<https://www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?id=7639983731>). Koncentracija ukupnog dušika (TN, engl. *Total Nitrogen*) mjerena je metodom persulfatne digestije na spektrometru (HACH DR 1900, Colorado, SAD) prema DR priručniku 3 (<https://www.hach.com/asset-get.download-en.jsa?id=7639983804>). Uzorci vode za mjerenje otopljenog organskog (DOC, engl. *dissolved organic carbon*) i anorganskog ugljika (DIC, engl. *dissolved inorganic carbon*) filtrirani su na terenu kroz membranski filter veličine pora 0,45 μm te analizirani u laboratoriju pomoću analizatora za određivanje ugljika u tekućim uzorcima (HACH QbD1200, Colorado, SAD). Za DOC analizu, prvo se uklonio DIC (pretvoren u CO_2 i isparen) dodatkom H_3PO_4 .

Sve navedene analize obavljene su unutar 24 h od odrađenog terena prema gore navedenim metodama u Hidrokemijskom laboratoriju na Hrvatskom geološkom institutu u Zagrebu.

3.3. Izolacija DNA, umnažanje PCR-om, sekvenciranje amplikona i bioinformatička obrada podataka

Ukupna genomska DNA izolirana je iz 51 uzorka DNeasy PowerWater kitom (Qiagen GmbH Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Izolirana i pročišćena DNA bila je pohranjena na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ do njenog daljnjeg korištenja.

Izolirana DNA korištena je za PCR umnažanje hipervarijabilne V4 regije gena, koja kodira 16S rRNA, korištenjem univerzalnog para početnica za identifikaciju prokariota 515F (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') (Parada i sur., 2015) i 806R (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3') (Apprill i sur., 2015). Također, umnožena je hipervarijabilna V9 regija gena, koja kodira 18S rRNA, korištenjem univerzalnih početnica za identifikaciju eukariota 1391F (5'-GTACACACCGCCCGTC-3') (Lane, 1991) i EukB (5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') (Amaral-Zettler i sur., 2009). Umnažanje DNA PCR-om provedeno je dodavanjem 3 μl izolirane DNA u konačni volumen od 25 μl za umnažanje dijela 16S rRNA gena koji je sadržavao 5 μl High Phusion HF pufera (New England BioLabs, Velika Britanija), 1,25 μl svake 10 μM početnice, 0,5 μl 10mM dNTP-a (New England BioLabs, Velika Britanija) i 0,25 μl Phusion High-Fidelity DNA polimeraze (New England BioLabs, Velika Britanija). Ostatak volumena sačinjavala je ultra čista PCR voda. Na

isti način, provedeno je i PCR umnažanje dijela 18S rRNA gena samo u duplom volumenu (50 µl). Kako bi se smanjile pogreške PCR reakcija, pripremljene su tri PCR reakcije po uzorku (triplikati) i objedinjene u jedan uzorak prije sekvenciranja (75 µl za prokariote, 150 µl za eukariote). Uvjeti PCR umnažanja dijela 16S rRNA gena bili su: početna denaturacija (94 °C, 3 min), 30 ciklusa denaturacije (94 °C, 45 s), sparivanje početnica (52 °C, 60 s), produljenje lanca (72 °C, 90 s) i konačno produljenje lanca (72 °C, 10 min) (Pjevac i sur., 2021). Protokol PCR umnažanja dijela 18S rRNA gena preuzet je sa stranice „Earth Microbiome project“ (<https://earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/18s/>) uz nekoliko manjih izmjena, a uvjeti su bili: početna denaturacija (95 °C, 5 min), 30 ciklusa denaturacije (94 °C, 30 s), sparivanje početnica (57 °C, 45 s) te produljenje lanca (72 °C, 1 min) i konačno produljenje lanca (72 °C, 2 min).

Uz pomoć ultra čiste PCR vode kao negativne kontrole, izmjerena je izolirana koncentracija DNA na nanofotometru (NanoPhotometer, N60/N50, IMPLLEN, Njemačka) ili na Qubit 4 fluorometru (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD). Gel elektroforezom na 1 % agaroznom gelu u TAE (tris-acetat-EDTA) puferu te s fluorescentnom bojom za gel (SYBR Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, ThermoFisher scientific, SAD) provjerena je dužina dobivenih amplikona u PCR reakciji. Tijekom gel elektroforeze, na gel su dodani: referentna DNA ljestvica duljine 1 kb (New England BioLabs, Velika Britanija) i negativna kontrola.

Osim što su bili umnoženi, svi uzorci 16S rRNA i 18S rRNA gena bili su barkodirani, pročišćeni, normalizirani i pripremljeni za sekvenciranje (*paired-end sequencing*) kako je detaljno opisano u Pjevac i sur. (2021). Svi V4 amplikoni i V9 amplikoni iz eksperimenta s procjednom vodom biootpada sekvencirani su na Illumina MiSeq platformi (V3, 600 ciklusa) u Središnjoj Mikrobiom Ustanovi Medicinskog sveučilišta u Beču (JMF, engl. *Joint Microbiome Facility of the Medical University of Vienna*). V9 amplikoni iz druge faze istraživanja sekvencirani su na Illumina NextSeq platformi u tvrtki za sekvenciranje (SeqIT GmbH & Co. KG, Kaiserslautern, Njemačka).

Bioinformatička obrada sirovih sekvenci 16S rRNA i 18S rRNA gena sekvenciranih na Illumina MiSeq platformi uključivala je analizu valjanih sekvenci koristeći zadane parametre FASTQ procedure (BaseSpace, Illumina). Sirove sekvence 18S rRNA gena sekvencirane na Illumina NextSeq platformi analizirane su korištenjem protokola prema QIIME2 platformi (v. 2019.10, Caporaso i sur., 2010). Iz sirovih sekvenci isključeni su PhiX sljedovi koji pripadaju virusima pomoću BBDuk alata (BBTools, Bushnell B, sourceforge.net/projects/bbmap). Uzorci su demultipleksirani uz pomoć paketa *demultiplex* (Laros JFJ, github.com/jfjlaros/demultiplex) ili *cutadapt* (v. 2.6., Martin, 2011). Sekvence su filtrirane prema Phred koeficijentu kvalitete

od 30 (99,9 %) te skraćene za dužinu barkodova, adaptera i početnica koristeći BBDuk alat ili *cutadapt* (v. 2.6., Martin, 2011). ASV tablica stvorena je koristeći standardni protokol iz paketa DADA2 (v. 1.10.0. /v. 1.20.0., Callahan i sur., 2016a; Callahan i sur., 2016b) u R-u (v. 4.1.1., R Core Team, 2021) te je sadržavala referentne sekvence grupirane na 99 % sličnosti. Na kraju, ASV tablici dodijeljena je pripadajuća taksonomija korištenjem SILVA baze podataka (Ref NR 99 release 138.1) za sekvence 16S rRNA, a korištenjem PR² baze podataka (v 4.13, Guillou i sur., 2013) za sekvence 18S rRNA preko SINA klasifikatora (v 1.6.1., Pruesse i sur., 2012).

3.4. PCR u realnom vremenu (qPCR, engl. *quantitative/real-time PCR*)

Na uzorcima geotermalne vode i kultura provedeni su qPCR testovi za kvantifikaciju broja gena AOA *amoA*, AOB *amoA*, comammox A *amoA*, comammox B *amoA*, *nxA*, *nxB* i 515-806 V4 regije.

Testovi su provedeni za svaki uzorak u triplicatu s negativnim (ultra čista voda) i pozitivnim (standardima $10^7 - 10^1$) kontrolama korištenjem sustava Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, Kalifornija, SAD). Korišteni standardi napravljeni su od umnoženih gena PCR metodom iz okolišnih uzoraka (96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD). Nakon toga, PCR produkti su prema uputama proizvođača pročišćeni kitom (OneStep PCR Inhibitor Removal kit, Zymo Research, Kalifornija, SAD), spojeni ligazom s PCR4-TOPO plazmidom (Invitrogen, Massachusetts, SAD) te transformirani u XL1-Blue Competent stanice (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD). Nakon detekcije pozitivnih klonova „*colony*“ PCR metodom s M13 početnicama, plazmidi su izolirani s QIAprep Spin Miniprep kitom (Qiagen, Kalifornija, SAD) i potom sekvencirani Sanger metodom. Koncentracije izoliranih plazmida izmjerene su na Qubit 4 fluorometru koji su se kasnije tijekom qPCR testova koristili kao standardi. U standardnoj krivulji koristio se broj kopija željenih gena u rasponu od 10^7 do 10^1 .

Umnažanje željenih gena u qPCR reakcijama provedeno je kombinacijom 10 µl 1x Sybr Green Supermix (Sso Advanced, Bio-Rad, Kalifornija, SAD), 0.5 µl (10 µM) početnica, 3 µl DNA te dodavanjem 6 µl ultra čiste vode do ukupnog volumena od 20 µl. U Tablici 3. navedeni su detalji o početnicama i qPCR uvjeti pojedinih gena.

Statistička analiza qPCR rezultata provela se u R sučelju. Konačni brojevi kopija funkcionalnih gena od interesa po litri uzorka geotermalne vode dobiveni su na način množenja dobivenog broja gena s volumenom eluirane DNA (µl) i faktorom razrijeđenja qPCR uzoraka dijeljeno s ukupnim volumenom vode koja je prošla kroz filter iz kojeg se izolirala DNA. Osim toga, da bi se prikazala točnija koncentracija gena od interesa naspram ukupne zajednice

bakterija i arheja, prethodno dobiveni rezultati broja kopija funkcionalnih gena su dijeljeni s brojem kopija gena ukupne zajednice prokariota dobivene kvantifikacijom 515 – 806 regije 16S rRNA gena. Stoga, dobiveni rezultati prikazuju količinu gena od interesa naspram ukupne zajednice arheja i bakterija. Dobivene kopije funkcionalnih gena qPCR reakcijom u uzorcima kultura odnose se na volumen od 100 ml po uzgojenoj kulturi te prikazuju stvarnu sliku dvogodišnjeg uzgoja.

Dobiveni qPCR rezultati kultura uspoređivani su s dobivenim qPCR rezultatima geotermalne vode odgovarajući lokaliteta (AVD, STU i KRE) s ciljem određivanja uspješnosti metoda kultiviranja funkcionalnih gena od interesa, tj. odabranih uvjeta uzgoja. Na isti način, zbog usporedbe s qPCR rezultatima te određivanja najpovoljnijeg supstrata i medija po pojedinom lokalitetu za uzgoj nitrificirajućih mikroorganizama iz geotermalnih voda u Hrvatskoj, obrađeni su i rezultati zastupljenosti pojedinih svojti od interesa na razini roda, dobiveni sekvenciranjem amplikona 16S rRNA. Korelacijska analiza na bazi Spearman koeficijenta korištena je pri provjeri potencijalne korelacije između broja kopija funkcionalnih gena kultura te između broja kopija funkcionalnih gena u geotermalnim vodama Hrvatske, a same vrijednosti su, prije izvođenja testa korelacije, transformirane *z-score* normalizacijom.

Tablica 3. Detaljan opis početnica i (q)PCR uvjeta umnažanja pojedinih gena od interesa.

| Gen | 515-806 (V4, 16S) | AOA <i>amoA</i> | AOB <i>amoA</i> | Cmx A <i>amoA</i> | Cmx B <i>amoA</i> | <i>nxA</i> | <i>nxB</i> |
|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| Dužina regije (pb) | 291 | 512 | 491 | 415 | 415 | 322 | 590 |
| Početnice | 515F 'Parada' 806F 'Appril' | Arch_104F Arch_616R | <i>amoA</i> _1F_alt <i>amoA</i> _2R | comaA-244F comaA-659R | comaB-244F comaB-659R | F1 <i>nxA</i> R2 <i>nxA</i> | Nxr-f27 Nxr-r617 |
| Nukleotidni slijed | 5'-GTGYCAGC MGCCGCGGT AA- 3' | 5'-GCAGGAGA CTAYATH TTC TA- 3' | 5'-GGGGTT TCTACTGGT GGT- 3' | 5'-TAYAA Y TGGGTSAA YTA- 3' | 5'-TAYTTCTG GACRTTY TA- 3' | 5'-CAGACC GACGTGTGC GAAAG - 3' | 5'-GAGGAG CGGCATCC GAAGT- 3' |
| | 5'-GGACTAC NVGGGTWTC TA- 3' | 5'-GCCATCCA TCTRTADGTC CA- 3' | 5'-CCCCTCK GSAAAGCCT TCTTC- 3' | 5'-ARATCAT SGTGCTR TG- 3' | 5'-ARATCCA RACDGTG TG- 3' | 5'-TCCACAA GGAACGGA AGGTC-3' | 5'-GGCABC GRTTCTGG TCG- 3' |
| Inicijalna denaturacija | 95 °C 3 min | 95 °C 15 min | 94 °C 5 min | 95 °C 3 min | 95 °C 3 min | 95 °C 5 min | 95 °C 5 min |
| Denaturacija | 95 °C 30 s 40 ciklusa | 95 °C 15 s 40 ciklusa | 94 °C 1 min 40 ciklusa | 95 °C 30 s 40 ciklusa | 95 °C 30 s 40 ciklusa | 94 °C 30 s 40 ciklusa | 95 °C 40 s 40 ciklusa |
| Sparivanje početnica | 50 °C 60 s | 60 °C 45 s | 60 °C 90 s | 56 °C 45 s | 56 °C 45 s | 55 °C 45 s | 54 °C 40 s |

| Gen | 515-806 (V4, 16S) | AOA <i>amoA</i> | AOB <i>amoA</i> | Cmx A <i>amoA</i> | Cmx B <i>amoA</i> | <i>nxrA</i> | <i>nxrB</i> |
|---|--|----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Produljivanje lanca (stvaranje slike) | 72 °C 45 s | 78 °C 10 s | 72 °C 90 s | 72 °C 30 s | 72 °C 30 s | 72 °C 45 s | 72 °C 90 s |
| Krivulja taljenja (engl. <i>melting curve</i>) | 45 °C – 95 °C 0:05 s - 0,5 °C / ciklus | | | | | | |
| Završno produljenje lanca (za „endpoint“ PCR) | 72 °C 10 min | 60 °C 10 min | 60 °C 90 s | 40 °C 30 s | 40 °C 30 s | 72 °C 5 min | 72 °C 10 min |
| Literatura korištenih početnica | Parada i sur., 2015 Appril i sur., 2015 | Alves i sur., 2013 | Rotthauwe i sur., 1997 | Pjevac i sur., 2017 | Pjevac i sur., 2017 | Wertz i sur., 2008 | Hong i sur., 2020 |

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka vezanih za dijelove 16S i 18S rRNA gena provedena je korištenjem R programskog jezika (v. 4.1.1., R Core Team, 2021). Sve analize provedene su pomoću Bionconductor (v. 3.14) paketa vegan (v. 2.5.7., Oksanen i sur., 2019), phyloseq (v. 1.38., McMurdie i Holmes, 2013), DESeq2 (v. 3.17, Love i sur., 2014), ggpubr (v. 0.6.0., Kassambara, 2023), microbiome (v. 1.16., Lahti i Shetty, 2012-2019), microViz (v. 0.9., Barnett i sur., 2021), corrplot (v. 0.92, Wei i Simko, 2021), dplyr (Wickham i sur., 2023), plyr (v. 1.8.8., Wickham, 2011), tidyr (v. 1.3.0., Wickham, 2023) i Tax4Fun (v. 1.1.5., Aßhauer i sur., 2015). Vizualizacija svih grafova odrađena je pomoću paketa ggplot2 (Wickham, 2016).

Prije statističke analize prokariotske zajednice, ASV-evi klasificirani kao eukarioti, mitohondriji ili kloroplasti su uklonjeni. Isto tako, dodatno filtriranje izvršeno je uklanjanjem ASV-eva kojima taksonomija nije uopće dodijeljena već na razini koljena te uklanjanjem onih ASV-eva koji se pojavljuju samo jednom (engl. *singletons*) i dva (engl. *doubletons*) puta u cijelom skupu podataka. Daljnjim proučavanjem zajednice na drugim taksonomskim kategorijama, ASV-evi bez dodijeljene taksonomije su se uklanjali.

Prije statističke analize eukariotske zajednice, uklonjeni su ASV-evi kojima nije dodijeljena taksonomija na razini supergrupe (v 4.13., Guillou i sur., 2013), a tijekom daljnjeg istraživanja uklonjeni su i ASV-evi bez dodijeljene taksonomije na razini razreda, porodice i roda. ASV-evi klasificirani kao proizvoljna grupa nazvana Metazoa zadržani su samo pri presjeku zajednice na svim lokalitetima, dok su uklonjeni u daljnjoj statističkoj obradi. ASV-evi koji se pojavljuju samo jednom i dva puta u cijelom skupu podataka zadržani su s obzirom na utvrđen manji broj sekvenci te općenito slabije poznatu taksonomiju mikrobnih eukariota.

Nakon filtriranja, relativna taksonomska brojnost prokariotske i eukariotske zajednice ispitana je formiranjem grupe „Ostatak“ (engl. „*Others*“) koja sadržava taksonomske skupine s relativnom brojnošću manjom od 1 %. Ponekad je relativna taksonomska zastupljenost mikrobnih zajednica prikazana u cijelosti te na nekim taksonomskim razinama i u obliku stvarne brojnosti (stvarni broj utvrđenih očitavanja).

Beta raznolikost izmjerenih fizikalno-kemijskih parametara kroz tri uzorkovane sezone prikazana je izvođenjem PCA (engl. *Prinipal Component Analysis*, engl. prijevod: Analiza glavnih komponenti) na normaliziranim podacima.

Statistički značajna razlika između različitih varijabli testirana je PERMANOVA testom (engl. *Permutational Multivariate Analysis of Variance*, engl. prijevod: Permutacijska multivarijatna analiza varijance) na matricama različitosti dobivenih Bray-Curtis koeficijentom

(Bray i Curtis, 1957). Ujedno, sličnosti bazirane na dobivenoj matrici vizualizirane su pomoću PCoA (engl. *Principal Coordinate Analysis*, engl. prijevod: Analiza glavnih koordinata) kako bi se utvrdile razlike između pronađenih prokariotskih i eukariotskih mikrobnih zajednica po lokalitetima, različitim skupinama vodonosnika, sezoni i danima uzorkovanja te vrsti pokusa. Nadovezujući se na ovo, okolišni parametri koji su pokazali potencijalni značajni utjecaj na oblikovanje strukture prokariotskih i eukariotskih mikrobnih zajednica ($p < 0,05$, PERMANOVA) izdvojeni su i ekstrapolirani na PCoA graf. Prije izvođenja PERMANOVA testa uzorci su normalizirani *z-score* normalizacijom.

Alfa raznolikost izračunata je pomoću Shannon-ovog (Shannon, 1948) i Simpson-ovog indeksa alfa raznolikosti (Simpson, 1949) te Chao1 indeksa (zapažena brojnost ASV-eva) na nefiltriranim (koji sadrže rijetke ASV-eve) i normaliziranim setovima podataka. Set podataka prokariota i eukariota podvrgnut je postupku svođenja svakog skupa podataka iz svakog uzorka na veličinu najmanjeg skupa podataka (na veličinu uzorka s najmanjim brojem utvrđenih ASV-eva) te nasumičnom izvlačenju ASV-eva pri čemu se dobiju međusobno usporedivi uzorci (engl. *rarefied dataset*).

Distribucija podataka utvrđivana je Shapiro testom, a ovisno o podacima, primjenom Pearson i Spearman korelacijskih koeficijenata, istražena je korelacija između izmjerenih fizikalno-kemijskih parametara kroz uzorkovane sezone, između identificiranih skupina od interesa te testiranih funkcionalnih gena. Prije testova korelacije, vrijednosti parametara su normalizirane s *z-score* normalizacijom.

Funkcionalno predviđanje metabolizma temeljene na podacima prokariotskih mikrobnih zajednica pronađenih u uzorcima vode provedeno je pomoću Tax4Fun analize koristeći zadane specifikacije. Izdvojene su i grafički objedinjene metaboličke funkcije vezane za ciklus dušika i sumpora.

S obzirom na dobivene rezultate statističkih analiza svih podataka te konačnom dodjelom konteksta prema dosad poznatoj literaturi o pronađenim predstavnicima mikrobnih zajednica, procijen je biotehnološki potencijal pojedinih geotermalnih lokaliteta i mikroorganizama te uzgojenih kultura.

3.6. Matematički modeli uzročnosti

Matematički modeli uzročnosti mikrobnih zajednica iz geotermalnih voda Hrvatske temeljili su se na prikupljenim fizikalno-kemijskim parametrima tijekom tri sezone

uzorkovanja (jesen 2019., proljeće 2020. i jesen 2020. godine) na 19 različitih geotermalnih lokaliteta (Slika 7).

Za analizu je primijenjena baza od ukupno 15 analiziranih fizikalno-kemijskih (abiotičkih) parametara te 11 različitih prokariotskih porodica vezanih za N i S cikluse kao biološki parametri (Prilog 3). Praćeni fizikalno-kemijski parametri su: temperatura, pH vrijednost, električna vodljivost, koncentracija otopljenog O₂ te iona Na⁺, Cl⁻, NH₄⁺, HCO₃⁻, NO₃⁻, H₂S, SO₄²⁻, TN, SiO₂, DIC i DOC. Praćene prokariotske porodice su: Campylobacteraceae = F1, Halothiobacillaceae = F2, Hydrogenophilaceae = F3, Nitrosocaldaceae = F4, Nitrosopumilaceae = F5, Nitrososphaeraceae = F6, Nitrosotaleaceae = F7, Sulfurimonadaceae = F8, Sulfurospirillaceae = F9, Sulfurovaceae = F10 i Nitrospiraceae = F11.

Procjena neposrednog utjecaja kauzalnog modela radila se prema formuli:

$$caus(x, y) = \frac{d}{dx} E_W(Y|X, W_1, W_2 \dots W_N)$$

pri čemu je x (uzrok), y (učinak) i W (zbunjujući čimbenik - „*confounding factor*“) te prema formuli:

$$caus(x_k, ASV) = \frac{cov(x_k - RF(x_k|X_{-k}), ASV - RF(ASV|X_{-k}))}{\sigma^2(x_k - RF(x_k|X_{-k}))}$$

pri čemu je x (matriks abiotičkih parametara), x_k (k abiotički uzrok), ASV (učinak zbog k uzroka) i RF (ML model „*by Random forest*“). Strukturni kauzalni model (SCM) prikazan je kao usmjereni aciklički graf (DAG) koji je osnova Bayesovog kauzalnog modela zbog prikazivanja vremenskog invarijantnog kauzalnog modela interakcija fizikalno-kemijskih parametara s biološkim komponentama (porodicama). Primijenjena metoda je HillClimbing optimiranje strukture modela Bayesove mreže (Scutari i sur., 2018).

Dobiveni podaci obuhvaćaju sve uzorkovane lokalitete kroz cjelokupno razdoblje od tri sezone uzorkovanja. Definicije kauzalnosti i modeli provedeni su prema *DoWhy* programu za analizu kauzalnosti (v. 0.9.1., Sharma i Kiciman, 2021), dok je statistička analiza podataka provedena računalnom podrškom R (v. 4.1.1., R Core Team, 2021).

3.7. Metode uzgoja termofilnih nitrificirajućih prokariota

Na temelju prikupljenih rezultata u prvoj fazi istraživanja, odabrane su tri lokacije geotermalnih voda za uzgoj nitrificirajućih mikroorganizama. Uzorci geotermalne vode

uzorkovani su u rujnu 2020. godine na lokalitetima: Antunovo vrelo (AVD, Daruvarske toplice), Stubičke toplice (STU) i Krečaves (KRE) te u listopadu 2021. godine samo na lokalitetu AVD. Isti dan nakon uzorkovanja, postavljen je daljnji eksperiment uzgoja. Cijela procedura uzgoja napravljena je prema prilagođenim uputama Bollmann i sur., 2011. te Spieck i Lipski, 2011.

3.7.1. Priprema medija za uzgoj

Tri vrste medija pripremljene su za potrebe uzgoja prokariotskih nitrificirajućih mikroorganizama u staklenom posuđu (DURAN, DWK Life Sciences, Engleska) i autoklavirani 15 – 30 minuta na 121 °C (Sterilizator OT 90L, NUVE, Ankara, Turska). Uzgoj je proveden u aseptičnim uvjetima pri optimalnim vrijednostima pH (6,0 do 8,0) i temperature (46 °C) na tekućim selektivnim hranjivim podlogama različitog sastava koji su ovisili o ranije utvrđenim fizikalno-kemijskim parametrima uzorkovanih lokaliteta. Pripremljeni mediji bili su: AOM medij s niskom koncentracijom CaCO₃ (engl. *Low CaCO₃ AOM medium*) (Lebedeva i sur., 2013), NOB medij bez NH₄Cl (engl. *NOB medium w/o NH₄Cl*) (Spieck i sur., 2020) i OHIO medij (prilagođeno prema Bollmann i sur., 2011). Kao četvrta vrsta medija korištena je originalna voda uzorkovanog izvora AVD. Ovisno o mediju i ciljanim nitrificirajućim mikroorganizmima, pH vrijednost medija i kultura održavala se u rasponu od 7,0 do 8,0 dodatkom pufera poput 1 M NaOH, 1 M NaHCO₃ i 1 M HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan sulfonska kiselina).

Svi mediji pripremljeni su sa steriliziranom ultra čistom vodom dodavanjem kemikalija navedenih u Tablici 4. Mediji su se razrijedili 10 puta za proceduru uzgoja te su se konačni mediji (1x) pripremili kombinacijom 100 ml 10x medija i 900 ml ultra čiste vode, a potom i autoklavirali. Ostatak medija (10x, 1x) pohranio se na + 4 °C.

Nakon autoklaviranja, 1x AOB mediju dodala se otopina elemenata u tragovima te otopina selena i volframa, a pH vrijednost se namjestila na 8,0 s puferskom otopinom HEPES uz pomoć pH metra (SI Analytics Lab 845, Xylem Inc., SAD).

Prije autoklaviranja 1x NOB medija, pH vrijednost namjestila se na ~ 8,4 – 8,6 uz pomoć pH metra, dok je nakon autoklaviranja pala na ~ 7,6 – 7,8. Nakon autoklaviranja, 1x NOB mediju dodala se otopina elemenata u tragovima te otopina selena i volframa.

Prije autoklaviranja 1x OHIO mediju dodale su se otopine elemenata u tragovima i otopina selena i volframa te 1 g HEPES-a, a pH vrijednost namjestila se između 7,8 – 8,0 s puferskom otopinom NaOH. Nakon autoklaviranja, 1x OHIO mediju dodano je 10 ml sterilne otopine KH₂PO₄ (100x).

Tablica 4. Recepti za medije (10 x) korišteni u pokusu uzgoja nitrificirajućih mikroorganizama.

| | Kemikalija | AOM medij (g/L) | NOB medij (g/L) | OHIO medij (g/L) |
|----|--|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1. | KH ₂ PO ₄ | 0,5 | 1,5 | - |
| 2. | KCl | 0,75 | - | 3,75 |
| 3. | MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,5 | 0,5 | 1,2 |
| 4. | NaCl | 5,84 | 5,0 | 29,2 |
| 5. | CaCO ₃ | 0,1 | 0,1 | - |
| 6. | CaCl ₂ x 2 H ₂ O | - | - | 0,55 |
| 7. | Autoklavirana destilirana ultra čista voda | do 1000 ml | do 1000 ml | do 1000 ml |

Otopina elemenata u tragovima pripremila se dodavanjem soli (1-7) iz Tablice 5. i njihovim otapanjem u ~ 997,5 ml destilirane ultra čiste vode. Zatim je dodano 2,5 ml koncentrirane klorovodične kiseline (HCl) i posljednja (8.) sol iz Tablice 5. Otopina se autoklavirala i pohranila na + 4 °C. Ukupno 1 ml otopine elemenata u tragovima dodaje se po 1 L medija (1x).

Tablica 5. Kemikalije korištene za izradu otopine elemenata u tragovima (TES, engl. *Trace Element Solution*, 1000x), (Lebedeva i sur., 2013).

| | Kemikalija | m (mg/L) |
|----|---|-----------------------|
| 1. | MnSO ₄ x 1 H ₂ O | 34,4 |
| 2. | H ₃ BO ₃ | 50,0 |
| 3. | ZnCl ₂ | 70,0 |
| 4. | Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 72,6 |
| 5. | CuCl ₂ x 2 H ₂ O | 20,0 |
| 6. | NiCl ₂ x 6 H ₂ O | 24,0 |
| 7. | CoCl ₂ x 6 H ₂ O | 80,0 |
| 8. | FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 1,0 x 10 ⁶ |

Otopina seleni i volframa pripremljena se dodavanjem kemikalija iz Tablice 6. u 1000 ml ultra čiste vode. Nakon autoklaviranja, otopina se pohranila na + 4 °C. Ukupno 1 ml otopine seleni i volframa dodaje se po 1 L medija (1x).

Tablica 6. Kemikalije korištene za pripremu otopine seleni i volframa (SeW, engl. *Selenite-Tungstate (wolframate) Solution*, 1000x), (Widdel, 1980).

| | Kemikalija | m (mg/L) |
|-----------|---|-----------------|
| 1. | Na ₂ SeO ₃ x 5 H ₂ O | 3,0 |
| 2. | Na ₂ WO ₄ x 2 H ₂ O | 4,0 |
| 3. | NaOH | 500 |

Za potrebe održavanja odgovarajuće pH vrijednosti tijekom uzgoja, koristile su se tri vrste pufera: NaOH, NaHCO₃ i HEPES. HEPES pufer (1 M HEPES, 0.6 M NaOH) pripremljen se otapanjem 1,2 g NaOH u ~ 25 ml ultra čiste vode te dodavanjem 11,92 g HEPES (bez kiseline). Pufer se snažno miješao dok se HEPES nije u potpunosti otopio te se volumen ultra čiste vode dopunio do 50 ml. Pufer se filtrirao kroz polikarbonatni membranski filter veličine pora 0,2 µm kako bi se uklonile preostale neotopljene čestice. Otopina se sterilizirala u autoklavu i pohranila na tamnom mjestu na + 4 °C. Otopina 1 M NaHCO₃ pripremljena se otapanjem 4,2 g NaHCO₃ u ~ 40 ml ultra čiste vode na magnetskoj mješalici pri temperaturi raspona ~ 30 – 40 °C. Nakon otapanja, volumen ultra čiste vode dopunio se do 50 ml te je otopina autoklavirana (121 °C, 15 – 30 min). Otopina je pohranjena na sobnoj temperaturi. Otopina 1 M NaOH pripremljena se otapanjem 3,997 g NaOH u 100 ml ultra čiste vode te se pohranila na + 4 °C.

3.7.2. Priprema supstrata za uzgoj

Supstrati poput NaNO₂ i NH₄Cl različitih koncentracija dodavani su u kulture s ciljem utvrđivanja najpovoljnijih laboratorijskih uvjeta za rast i razvoj nitrificirajućih mikroorganizama (Spieck i Lipski, 2011). Supstrati su dodavani za potrebe održavanja aktivnih kultura nakon utvrđene konverzije spojeva (Tablica 7). Sve navedene otopine pripremljene su u aseptičnim uvjetima te autoklavirane (121 °C, 15 – 30 min).

Otopina antibiotika kanamicin monosulfata (C₁₈H₃₈N₄O₁₅S) dodavala se u kulture s ciljem pokušaja dodatne selekcije mikroorganizama od interesa. Otopina se pripremljena otapanjem 500 mg kanamicina u 5 ml ultra čiste vode te se sterilno filtrirala na špricu i filter

veliĉine pora 0,2 μm . Otopina se pohranila na + 4 °C. Na 100 ml kulture dodaje se 10 μl antibiotika kanamicina.

Tablica 7. Koncentracije korištenih supstrata za odrŹavanje aktivnih kultura.

| | Kemikalija | m (g/L) | Poĉetna (mM) koncentracija supstrata | Konaĉna (mM) koncentracija u 100 ml kulture |
|-----------|--------------------|----------------|---|--|
| 1. | NaNO ₂ | 2,001 | 29 | 0,29 |
| 2. | NaNO ₂ | 0,2001 | 2,9 | 0,029 |
| 3. | NaNO ₂ | 0,02 | 0,29 | 0,0029 |
| 4. | NaNO ₂ | 0,69 | 10 | 0,1 |
| 5. | NH ₄ Cl | 1,3373 | 25 | 0,25 |
| 6. | NH ₄ Cl | 0,5349 | 10 | 0,1 |

3.7.3. Postupak inicijalnog uzgoja (engl. *enrichment procedure*)

Cijela procedura uzgoja odrađena je u aseptiĉnim uvjetima s prethodno steriliziranim laboratorijskim posuđem. Pipetor (OASIS pipet4u, AHN Biotechnologie GmbH, Njemaĉka) sa sterilnim seroloŹskim pipetama veliĉine 1 – 100 ml i hidrofobnim filterom korišten je za raspoređivanje medija i nasađivanje uzoraka te dodavanje pripradajućih supstrata. Na 90 ml svakog medija dodano je 10 ml uzorka (AVD, STU i KRE) te 1 ml odgovarajućeg supstrata za rast i razvoj mikroorganizama od interesa. Supstrati su dalje tijekom uzgoja dodavani prema potrebi, odnosno prema utvrđenoj konverziji spojeva. Napravljene su po dvije negativne kontrole koje su sadržavale samo 90 ml 1x medija bez pripadajućeg uzorka s ciljem provjere kontaminacije medija. Popis uzgajanih kultura sa odgovarajućim medijem i supstratima nalazi se u Tablici 8.

3.7.4. OdrŹavanje i praćenje rasta kultura

Inokulirane kulture pregledavane su tri puta tjedno u laminaru s ciljem odrŹavanja potrebnih uvjeta za rast i razvoj prokariotskih mikroorganizama od interesa, poput optimalnog pH te s ciljem utvrđivanja konverzije spojeva karakteristiĉnih za proces nitrifikacije poput oksidacije NH₄⁺ u NO₂⁻ i oksidacije NO₂⁻ u NO₃⁻ pri ĉemu je potroŹnja NH₄⁺ i NO₂⁻ sluŹila kao indikacija rasta mikroorganizama od interesa.

U slučaju utvrđene konverzije spojeva NH_4^+ u NO_2^- te NO_2^- u NO_3^- te utvrđenih nedostatka NH_4^+ i NO_2^- u kulturama, dodan je novi volumen odgovarajućih supstrata. Osim toga, s ciljem održavanja aktivnih kultura, nakon utvrđene aktivnosti, odnosno konvertirane koncentracije od 1 mM pripadajućeg supstrata u kulturama, napravljeno je novo naciepljivanje iz originalne kulture te potom pripadajuća razrjeđenja od 10^{-1} do 10^{-4} . Pri tome je na 90 ml odgovarajućeg medija dodano 10 ml uzorka iz prethodnog razrjeđenja sve do konačnog razrjeđenja od 10^{-4} . Osim originalnih kultura, nova razrjeđenja aktivno su održavana te u slučaju konvertirane koncentracije od 1 mM pripadajućeg supstrata, spremljena na $+4\text{ }^\circ\text{C}$.

Pomoću qPCR metode kvantificirali su se odabrani geni vezani za ciklus dušika poput *amoA*, *nxrA* i *nxB* s ciljem određivanja koncentracije uzgojenih gena karakterističnih za odvijanje pojedinih koraka unutar procesa nitrifikacije. Korištene qPCR metode detaljnije su opisane u 3.4. odjeljku.

Konačan napredak i rast kultura utvrđen je nultim sekvenciranjem 16S rRNA gena te sekvenciranjem kultura nakon jedne i dvije godine od početka uzgoja. Za potrebe sekvenciranja uzorci kultura dobro su se promiješali te se u aseptičnim uvjetima izdvojilo 2 ml kultura u sterilne Eppendorf tubice. Uzorci su se centrifugirali na 12 000 G po 10 minuta. Nakon centrifugiranja, 1800 μl supernatanta je odvojeno, a preostalih 200 μl kultura s dna tubica pohranjeno je na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do daljnje procedure sekvenciranja obavljene prema Pjevac i sur. (2021) na Illumina MiSeq platformi (V3, 600 ciklusa) u Središnjoj Mikrobiom Ustanovi Medicinskog sveučilišta u Beču. Statistička obrada podataka odrađena je kako je navedeno u odjeljku 3.5.

Tablica 8. Popis uzgojenih i aktivnih (analiziranih) kultura iz geotermalnih voda Hrvatske s pripadajućim informacijama o mediju i supstratima.

| Oznaka kulture | Lokalitet | Datum kultiviranja | Medij | Supstrat | Antibiotik |
|--------------------------------|------------------|--------------------|-------|---------------------------|------------|
| AVD 0,29 | Antunovo vrelo | 03.09.2020. | NOB | 0,29 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 2,9 | Antunovo vrelo | 03.09.2020. | NOB | 2,9 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 2,9 10⁻¹ | Antunovo vrelo | 29.11.2021. | NOB | 2,9 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 2,9 10⁻² | Antunovo vrelo | 29.11.2021. | NOB | 2,9 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 2,9 10⁻³ | Antunovo vrelo | 29.11.2021. | NOB | 2,9 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 2,9 10⁻⁴ | Antunovo vrelo | 29.11.2021. | NOB | 2,9 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 29 | Antunovo vrelo | 03.09.2020. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 29 10⁻² | Antunovo vrelo | 29.11.2021. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 29 10⁻³ | Antunovo vrelo | 29.11.2021. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 29 10⁻⁴ | Antunovo vrelo | 29.11.2021. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |
| AVD 25 | Antunovo vrelo | 03.09.2020. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| AVD 25 10⁻¹ | Antunovo vrelo | 26.01.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| AVD 25 10⁻² | Antunovo vrelo | 26.01.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| AVD 25 10⁻³ | Antunovo vrelo | 26.01.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| AVD 25 10⁻⁴ | Antunovo vrelo | 26.01.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| AVD 25⁺ | Antunovo vrelo | 03.09.2020. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | Kanamycin |
| STU 0,29 | Stubičke toplice | 03.09.2020. | NOB | 0,29 mM NaNO ₂ | - |
| STU 2,9 | Stubičke toplice | 03.09.2020. | NOB | 2,9 mM NaNO ₂ | - |
| STU 29 | Stubičke toplice | 03.09.2020. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |

| Oznaka kulture | Lokalitet | Datum kultiviranja | Medij | Supstrat | Antibiotik |
|---|------------------|--------------------|------------------|---------------------------|------------|
| STU 29 10⁻³ | Stubičke toplice | 29.11.2021. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |
| STU 29 10⁻⁴ | Stubičke toplice | 29.11.2021. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |
| STU 25 | Stubičke toplice | 03.09.2020. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| STU 25 10⁻¹ | Stubičke toplice | 24.02.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| STU 25 10⁻² | Stubičke toplice | 24.02.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| STU 25 10⁻³ | Stubičke toplice | 24.02.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| STU 25 10⁻⁴ | Stubičke toplice | 24.02.2022. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| STU 25⁺ | Stubičke toplice | 03.09.2020. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | Kanamycin |
| KRE 0,29 | Krečaves | 03.09.2020. | NOB | 0,29 mM NaNO ₂ | - |
| KRE 2,9 | Krečaves | 03.09.2020. | NOB | 2,9 mM NaNO ₂ | - |
| KRE 29 | Krečaves | 03.09.2020. | NOB | 29 mM NaNO ₂ | - |
| KRE 25 | Krečaves | 03.09.2020. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | - |
| KRE 25⁺ | Krečaves | 03.09.2020. | AOM | 25 mM NH ₄ Cl | Kanamycin |
| 1 AVD NaNO₂ | Antunovo vrelo | 07.10.2021. | Geotermalna voda | 10 mM NaNO ₂ | - |
| 2 AVD NaNO₂ | Antunovo vrelo | 07.10.2021. | Geotermalna voda | 10 mM NaNO ₂ | - |
| 3 AVD NaNO₂ | Antunovo vrelo | 07.10.2021. | Geotermalna voda | 10 mM NaNO ₂ | - |
| 1 AVD NH₄Cl | Antunovo vrelo | 07.10.2021. | OHIO | 10 mM NH ₄ Cl | - |
| 1 AVD NH₄Cl 10⁻³ | Antunovo vrelo | 06.12.2021. | OHIO | 10 mM NH ₄ Cl | - |
| 1 AVD NH₄Cl 10⁻⁴ | Antunovo vrelo | 06.12.2021. | OHIO | 10 mM NH ₄ Cl | - |
| 2 AVD NH₄Cl | Antunovo vrelo | 07.10.2021. | Geotermalna voda | 10 mM NH ₄ Cl | - |
| AVD NH₄Cl^{Kan} | Antunovo vrelo | 07.10.2021. | Geotermalna voda | 10 mM NH ₄ Cl | Kanamycin |

3.7.4.1. Brza laboratorijska evaluacija konverzije spojeva

Za brzu i svakodnevnu laboratorijsku procjenu i utvrđivanje pH vrijednosti kultura te različite koncentracije NH_4^+ , NO_2^- i NO_3^- korištene su analitičke testne trake (Quantofix, Macherey-Nagel, Njemačka). Osim toga, za utvrđivanje prisutnosti NH_4^+ korišten je i Nesslerov reagens (GRAM-MOL d.o.o., Hrvatska).

3.7.4.2. Kolorimetrijska determinacija amonija, nitrita i nitrata u kulturama

Osim brzih testova utvrđivanja konverzije dušikovih spojeva u uzorcima kultura, koncentracija konvertiranih spojeva utvrđena je testom za kolorimetrijsku determinaciju dušikovih spojeva prema prilagođenim protokolima Kandeler i Gerber (1988), Miranda i sur., (2001) te Hood-Nowotny i sur. (2010).

Kolorimetrijska determinacija nutrijenata provedena je u pločama od 96 jažica (engl. *96-well plates*), a apsorbance su mjerene na spektrofotometru (Tecan - Microplate Reader - Infinite 200 Pro, DKSH, Japan). Prije početka kolorimetrijske determinacije, uzorci i standardi su se pomiješali s ultra čistom vodom u omjeru 1:2 u glavnoj 96-ploči (volumena jažica 2 ml), a mjereni su u duplikatima u normalnim 96-pločama (volumena jažica 500 μl).

Standardne otopine (NaNO_2 , NaNO_3 i NH_4Cl) za kolorimetrijsku determinaciju nitrificirajućih spojeva imale su sljedeće koncentracije: 1 mM, 500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,25 μM , 15,625 μM , 7,8 μM i 3,9 μM . Svaki standard razrijeđen je u omjeru 1:2 u usporedbi sa standardom prije.

Za utvrđivanje koncentracije konvertiranog NH_4^+ pripremljene su otopine 0,2 M NaOH i otopina natrijevog salicilata te oksidacijski reagens prema Tablici 9. Otopina NaOH i otopina natrijevog salicilata pomiješane su u omjeru 1:1 te su sačinjavale žuto obojeni reagens korišten pri determinaciji NH_4^+ . Nakon dodavanja 75 μl obojenog i 30 μl oksidacijskog reagensa u svaku jažicu s 150 μl uzorka/standarda, slijedila je inkubacija u otopini 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi te mjerenje apsorbance na 660 nm.

Za utvrđivanje koncentracije konvertiranog NO_2^- pripremljene su otopine Griess reagensa 1 i Griess reagensa 2 koje su pomiješane s ultra čistom vodom u omjeru 1:1:1,3 te su sačinjavale determinacijsku otopinu za NO_2^- (Tablica 10). Ukupno je dodano 750 μl determinacijske otopine u svaku jažicu glavne 96-ploče. Apsorbanca svakog uzorka/standarda (200 μl) mjerila se na 540 nm odmah po stavljanju u normalne 96-ploče.

Za utvrđivanje koncentracije nastalog NO_3^- , nakon determinacijske otopine za NO_2^- , dodano je i 50 μl vanadijev (III) klorida u svaku jažicu (Tablica 10). Uzorci su se pokrili PCR folijom da se spriječi isparavanje te inkubirali u otopini na 60 °C po 60 minuta, a potom je mjerena apsorbancija uzoraka/standarda (200 μl) u normalnim 96-pločama na 540 nm.

Tablica 9. Otopine potrebne za utvrđivanje koncentracije konvertiranog NH_4^+ .

| Konačni reagens | Kemikalija | m (g/200 ml) |
|--------------------------------------|--|--------------|
| 0,2 M NaOH | NaOH | 1,6 |
| Otopina natrijevog salicilata | $\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_3$ | 34 |
| | $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,256 |
| Oksidacijski reagens | $\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_3$ | 0,2 |

Tablica 10. Otopine potrebne za utvrđivanje koncentracije konvertiranog NO_2^- i nastalog NO_3^-

| Konačni reagens | Kemikalija | V/m (ml ili g/250 ml ultra čiste vode) |
|-------------------------------|--|--|
| Vanadijev (III) klorid | 1 M HCl (37 %) | 21 ml/229 ml ultra čiste vode |
| | VCl_3 | 2,5 |
| Griess reagens 1 | $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$ | 0,05 |
| Griess reagens 2 | 3 M HCl (37 %) | 62,5 ml/187,5 ml ultra čiste vode |
| | $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ | 2,5 |

3.8. Biološka obrada procjedne vode biootpada

3.8.1. Postavljanje eksperimenta

Nakon dvije godine održavanja kultura, proučavana je razgradnja organske tvari dosad uzgojenim mikroorganizmima. Drugim riječima, zbog procjene biotehnološkog potencijala uzgojenih kultura, pratilo se poboljšanje postupka biološke obrade otpadnih voda, odnosno procesa bioremedijacije. Supstrat za razgrađivanje bio je biootpad (Slika 8A) od kojeg je

priređen eluat tretiran kao simulacija otpadne procjedne vode (Slika 8B) prema normi: EN 12457-4:2002 („Characterization of waste – Leaching; Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges – Part 4: One-stage batch test at a liquid to solids ratio of 10 L/kg for materials with particle size below 10 (without or with size reduction)“, European Committee for Standardization). Biootpad je biljnog porijekla sakupljan nekoliko dana, a sačinjen je od ostataka voća i povrća te drugog biljnog otpada poput granja i lišća ukupne mase 500,2 g (Slika 8A, Tablica 11).

Tablica 11. Sastav biootpada korišten za pripremu eluata tretiranog kao simulacija otpadne procjedne vode.

| Vrsta biootpada | Masa (g) |
|------------------------|-----------------|
| Kora banane | 42,8 |
| Kora jabuke | 12,2 |
| Kora limuna | 18,6 |
| Kora naranče | 12,2 |
| Kora celera | 13,6 |
| Kora cikle | 9,1 |
| Kora krumpira | 122,6 |
| Kora luka | 13,6 |
| Kora mrkve | 40,9 |
| Kora rajčice | 18,2 |
| Kora tikve | 9,1 |
| Kupus | 49,9 |
| Kruh | 46,1 |
| Ljuske jaja | 4,5 |
| Granje | 12,4 |
| Lišće | 74,4 |
| UKUPNO | 500,2 |

Prije pripravljanja eluata te svih analiza, u uzorku supstrata određen je organski udio i sadržaj vlage koji je važan za poboljšanje aktivnosti mikroorganizama. Centrifugiranjem (Sigma 3K15, Burladingen, Njemačka) usitnjenog i homogeniziranog uzorka biootpada odvojila se procjedna voda biootpada (eluat) korištena u daljnjem eksperimentu (Slika 8B).



Slika 8. Uzorak biootpada (A) od kojeg je priređen eluat, tj. otpadna procjedna voda (B) korištena u eksperimentu.

Postavljena su tri pokusa kombinacijom biostimulacije i bioaugmentacije: Pokus 1 – uzorak procjedne vode biootpada (kontrola bez egzogenog dodatka), Pokus 2 – procjedna voda biootpada + dodatak 10 ml egzogene kulture A (mješavine kultura lokaliteta KRE) i Pokus 3 – procjedna voda biootpada + dodatak 10 ml egzogene kulture B (mješavine kultura lokaliteta AVD). U postupku bioaugmentacije u Pokusima 2 i 3, korištene su po tri kulture svakog lokaliteta koje su činile konačnu kulturu A (KRE 0,29, KRE 2,9, KRE 29) i konačnu kulturu B (1 AVD NaNO₂, 2 AVD NaNO₂ i AVD 2,9), a pomiješale su se zbog povećanja optičke gustoće mikroorganizama. Razvoj pokusa i prikupljanje uzoraka za analizu pratili su se tijekom 20 dana te su analize provedene u duplikatima i triplikatima prema standardnim metodama APHA (APHA, 2012). Pokusi su se odvijali u staklenom posuđu pri radnom volumenu od 500 ml te temperaturi od 25 °C ± 2 °C. Uzorci su se kontinuirano miješali na rotacijskoj tresilici (Grant-bio PSU-10i, Leicestershire, Engleska) brzinom vrtnje 160 okr/min.

Drugim riječima, sva tri pokusa provedena su u šaržnom (zatvorenom) sustavu bez izmjene tvari s okolinom uz kontinuirano miješanje kako bi se osigurala homogenost sastava reakcijske smjese i temperature u aerobnim uvjetima. Temperatura nije prelazila definirani raspon ni u kontrolnom pokusu niti u pokusima s dodacima egzogenih termofilnih kultura jer inače bakterije u sustavima za pročišćavanje otpadnih voda najbolje funkcioniraju unutar

temperaturnog raspona između 20 – 30 °C, što predstavlja ekonomičan proces u biotehnologiji. Na ovaj način, nastojalo se izbjeći povećanje troškova uzrokovano visokim temperaturama u reakcijskim smjesama i reaktorima te istražiti mogućnosti prilagodbe, preživljavanja i aktivnosti termofila na niže temperature zbog potencijalnih biotehnoških procesa koji bi uključivali termofilne mikroorganizme, a i dalje ostali ekonomični.

3.8.2. Praćenje razvoja mikrobnih zajednica i razgradnje procjedne vode biootpada

Tijekom 8 dana (1., 2., 3., 4., 6., 7., 8., i 10. dan) u uzorcima eluata svih pokusa su mjereni pH vrijednost, električna vodljivost (EC), koncentracija otopljenog kisika (O₂), kemijska potrošnja kisika (KPK/COD, engl. *Chemical oxygen demand*), ukupna suspendirana tvar (TSS, engl. *Total Suspended Solids*) i optička gustoća (OG). Osim toga, uzorci su uzorkovani za mjerenje kemijskog sastava metodom ionske kromatografije, za utvrđivanje sastava prokariota i eukariota sekvenciranjem dijela 16S i 18S rRNA gena te za fluorescentnu mikroskopiju. Zbog usporavanja i stagniranja procesa razgradnje, preostalih dana (13., 15., 17 i 20. dan) uzeti su uzorci samo za potrebe sekvenciranja i mikroskopiranja s ciljem utvrđivanja daljnjih promjena u sastavu zajednice, tj. mogućnosti opstanka zajednice što je izrazito važno u prirodnim biološkim sustavima obrade otpadnih voda. Miris i boja eluata praćeni su tijekom prvih 10 dana odvijanja pokusa jer u okolišu često prvi upozoravaju na potencijalne opasnosti. Boja je određena spektrofotometrijski (Hach, model DR/2400, SAD) pri valnoj duljini (λ) od 455 nm i 465 nm nakon uklanjanja mutnoće kroz membranu (0,45 μ m) zbog moguće interferencije s bojom.

Vrijednosti pH, električne vodljivosti (EC) i koncentracije otopljenog kisika (O₂) mjerene su pomoću multi-parametarske WTW sonde (WTW Multi 340i, Weilheim, Njemačka) s elektrodama WTW SenTix® za pH, WTW Tetracon 325 za vodljivost i WTW FDO 925 za kisik. Odrađena je kalibracija sonde s pripadajućim elektrodama prije svake upotrebe.

Optička gustoća (OG) određivana je u eluatu spektrofotometrijski (Hach, model DR/2400, SAD) pri $\lambda = 600$ nm.

Vrijednosti KPK kao pokazatelji ukupnog organskog opterećenja u uzorcima procjedne vode, određivane su bikromatnom metodom, dok je sama vrijednost utrošenog kalijevog bikromata izmjerena spektrofotometrijski (Hach, model DR/2400, SAD) pri $\lambda = 670$ nm prema standardnoj APHA metodi (APHA, 2012). Bikromatna metoda postupak je koji se temelji na oksidaciji organskih tvari u uzorcima dodatkom kalijevog bikromata u sumporno-kiselom

mediju pri čemu srebrov sulfat djeluje kao katalizator, a provodi se kuhanjem 2 h na 150 °C u zatvorenim kivetama u bloku za digestiju. Konačna KPK vrijednost izražena je kao ekvivalent kisika proporcionalan utrošku kalijevog bikromata.

Prema istoj APHA metodi (APHA, 2012), određivane su i vrijednosti TSS. Uzorak se filtrirao kroz membranski filter veličine pora 0,45 µm nakon čega je slijedilo sušenje u sušioniku pri 105 °C do konstantne mase. Iz razlike u masi osušenog filtera s uzorkom i praznog filtera izračunala se vrijednost TSS izražena u g/L.

Za određivanje kemijskog sastava ionskom kromatografijom (Dionex ICS-1100, kolona Dionex IonPac AS14A, Kalifornija, SAD), uzorci su filtrirani kroz membranski filter veličine pora 0,22 µm, nakon čega je provedeno mjerenje koncentracija pojedinih analita s naglaskom na nutrijente (NO_3^- , PO_4^{3-}).

Za potrebe sekvenciranja uzorkovana su 2 ml svakog pokusa po danima, nakon čega su uzorci centrifugirani (10 min, 10 000 G). Nakon odvajanja supernatanta od taloga, na talog se dodalo 2 ml fiziološke otopine (0,9 % NaCl) te je slijedilo ponovno centrifugiranje (2 min, 10 000 G). Ovaj postupak ponovljen je dva puta. Nakon zadnjeg centrifugiranja, ostavljen je talog s dijelom supernatanta (oko 100 µl) te se navedeni volumen koristio u daljnjem postupku izolacije DNA s DNeasy PowerSoil Pro kitom (Qiagen GmbH Hilden, Njemačka). Ukupna genomska DNA izolirana je navedenim kitom iz 36 uzoraka prema uputama proizvođača. Koncentracija izolirane DNA mjerena je na Qubit 4 fluorometru (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD). Prije sekvenciranja, napravljena je qPCR metoda s univerzalnim 515F i 806R početnicama s ciljem provjere prisutnosti bakterijske DNA. Rezultati qPCR metode dodatno su se provjerili gel elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. Nadalje, uzorci su pripremljeni za sekvenciranje prema Pjevac i sur. (2021) te potom sekvencirani na Illumina MiSeq platformi (V3, 600 ciklusa) u Središnjoj Mikrobiom Ustanovi Medicinskog sveučilišta u Beču. Statistička obrada podataka odrađena je kako je navedeno u odjeljku 3.5.

Za potrebe fluorescentne mikroskopije, neposredno nakon uzorkovanja svakog uzorka dodan je 36 % formaldehid s ciljem fiksacije stanica na ukupnih 1 - 3 %. Potom je slijedila priprema uzoraka za bojanje s DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) bojom: 1) 10 µl uzorka dodano je u jažicu predmetnog stakalca (svaki uzorak napravljen je u triplicatu) i 2) predmetna stakalca sušila su se u inkubatoru na 46 °C. Nakon sušenja, 10 µl DAPI boje dodano je u svaku jažicu s uzorkom te su se predmetna stakalca s uzorcima i DAPI bojom inkubirala 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon završetka inkubacije, predmetna stakalca su isprana sa PBS-om (engl. *Phosphate-Buffered Saline*, engl. prijevod: slana otopina s fosfatnim puferom) tri puta te su potom oprana u hladnoj ultra čistoj vodi. Nakon sušenja stakalca na zraku, dodana

je 1 kap CitiFluor Mountant Solution-a (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD) u svaku jažicu s uzorkom, stavljena je pokrovnica te su uzorci bili spremni za snimanje na fluorescentnom mikroskopu s ugrađenom kamerom (ZEISS AXIO Imager.Z2, ZEISS Axiocam 305 color, objektiv 63x i 100x (imerzijsko ulje), Jena, Njemačka) korištenjem programskog paketa za obradu mikrofotografija (ZEN Blue 2.5, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Njemačka).

4. REZULTATI

4.1. Prva faza istraživanja

4.1.1. Karakteristike fizikalno-kemijskih parametara

Izmjereni i analizirani fizikalno-kemijski parametri vode razlikuju se ovisno o lokalitetima na kojima su provedena istraživanja. Sezona uzorkovanja nije imala značajan utjecaj na promjene temperature vode (Tablica 12). Temperatura vode na 6 geotermalnih lokaliteta nikada nije izmjerena većom od 40 °C, što te lokalitete čini pogodnim staništem za razvoj mezofilnih i umjereno termofilnih mikroorganizama. Na 7 istraživanih geotermalnih izvora i bušotina izmjerena temperatura vode bila je između 40 – 60 °C, dok je na preostalih 6 lokaliteta izmjerena temperatura bila iznad 60 °C, zbog čega ovi lokaliteti predstavljaju izuzetno pogodna staništa za život obligatnih termofila. Vrijednosti pH bile su u neutralnom do blago lužnatom području, u rasponu između 6,3 – 8,3 na svim uzorkovanim geotermalnim lokalitetima tijekom sve tri sezone uzorkovanja (Tablica 12).

Najviše koncentracije O₂ izmjerene su u SJA (6.3 – 6.8 mg/L) i IVD (3.7 – 5.1 mg/L). Ujedno, ovi lokaliteti predstavljaju jedine geotermalne lokalitete koji su ostali oksični tijekom sve tri sezone uzorkovanja (O₂ koncentracija > 4.5 μM (> 1 mg/L) (Orsi i sur., 2012)). Većina uzorkovanih geotermalnih izvora i bušotina bila je disoksična do anoksična (O₂ koncentracija < 4.5 μM (< 1 mg/L) (Orsi i sur., 2012)) tijekom svih sezona (Tablica 12). Na 5 lokaliteta (KRE, LIP, BOŠ, BIZ i IST) uzorci prikupljeni tijekom jeseni 2019. i proljeća 2020. godine bili su disoksični do anoksični, dok su uzorci s ovih lokaliteta uzorkovani tijekom jeseni 2020. bili oksični. S druge strane, geotermalni izvori AVD i TOP bili su oksični tijekom dvije sezone uzorkovanja (jesen 2019. i 2020.), a disoksični do anoksični u uzorcima uzorkovanim tijekom proljeća 2020. U uzorcima geotermalne vode lokaliteta VAR, DAB, IST, KRE, TOP i BIZ izmjerene su visoke koncentracije sulfida (> 2 mg/L H₂S) najmanje tijekom jedne sezone uzorkovanja (Tablica 12). Koncentracije sulfata varirale su ovisno o mjestu uzorkovanja, a ukoliko su bile povišene, zadržavale su visoke vrijednosti tijekom svih sezona uzorkovanja i obrnuto. Koncentracije DOC, DIC i anorganskih dušikovih spojeva (NH₄⁺ i NO₃⁻) prilično su varirale ovisno o mjestu i sezoni uzorkovanja (Tablica 12).

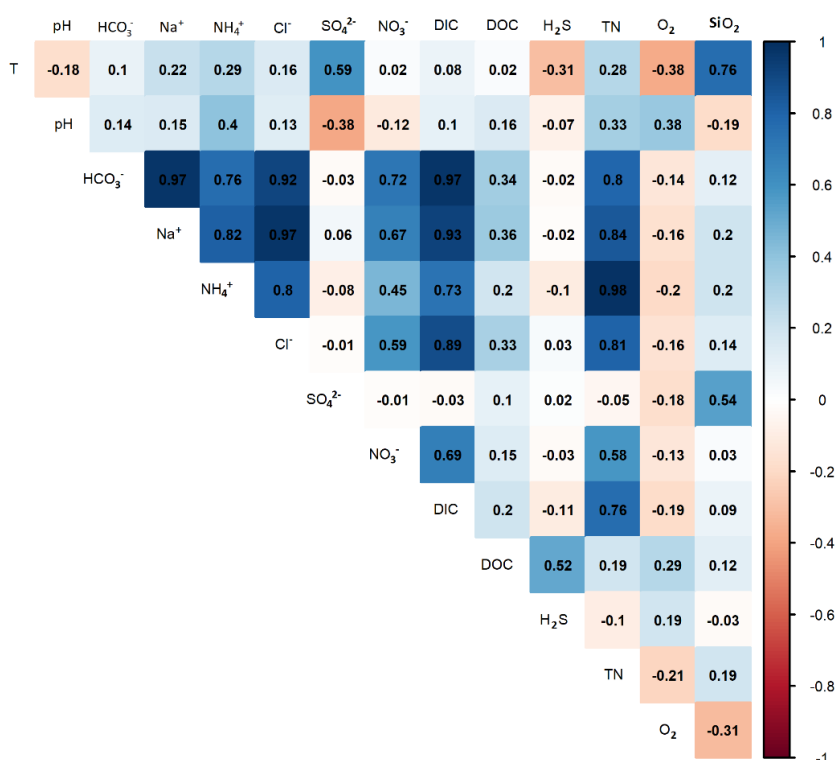
Većina analiziranih kemijskih parametara međusobno ne koreliraju značajno, osim utvrđene jake pozitivne korelacije između koncentracija NH₄⁺ i TN, kao i međusobne jake pozitivne korelacije koncentracija Na⁺, Cl⁻, HCO₃⁻, DIC i električne vodljivosti (EC) (Slika 9).

Tablica 12. Izmjereni i analizirani fizikalno-kemijski parametri geotermalnih voda u Hrvatskoj.

| Oznaka lokaliteta | Sezona | T (°C) | pH | O ₂ (mg/L) | EC (µS/cm) | Na ⁺ (mg/L) | Cl ⁻ (mg/L) | DIC (mg/L) | DOC (mg/l) | NH ₄ ⁺ (mg/L) | NO ₃ ⁻ (mg/L) | TN (mg/L) | SO ₄ ²⁻ (mg/L) | H ₂ S (mg/L) | SiO ₂ (mg/L) |
|-------------------|---------|--------|------|-----------------------|------------|------------------------|------------------------|------------|------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| AVD | J.2019. | 47 | 7,1 | 3,10 | 583 | 13,6 | 1,5 | 64,9 | 0,20 | 0,2 | 0,0 | <1 | 49,7 | 0,44 | 38,9 |
| | P.2020. | 48,8 | 6,79 | 0,03 | 537 | 13,6 | 2,0 | 62,7 | 22,46 | 0,32 | 0,0 | <1 | 54,4 | 0,44 | 40,3 |
| | J.2020. | 46,8 | 6,9 | 2,99 | 822 | 13,6 | 1,4 | 71,5 | 0,77 | 0,19 | 0,0 | <1 | 52,1 | 0,04 | 40,1 |
| BIZ | J.2019. | 64 | 7,6 | 0,00 | 4830 | 1147,4 | 688,1 | 390,0 | 35,50 | 18,4 | 7,8 | 16 | 20,4 | 1,8 | 69,3 |
| | P.2020. | 64 | 7,45 | 0,00 | 4860 | 1125,7 | 1360,7 | 186,3 | 3,77 | 8,82 | 0,0 | 6,5 | 10,3 | 1,8 | 65,3 |
| | J.2020. | 64,8 | 7,75 | 2,16 | 8913 | 1826,9 | 1270,9 | 323,3 | 86 | 15,81 | 4,9 | 12,4 | 11,2 | 2,1 | 68,0 |
| BOS | J.2019. | 63,4 | 7,9 | 0,00 | 4180 | 848,5 | 749,0 | 220,0 | 15,20 | 28,6 | 0,0 | 24 | 4,1 | 1,6 | 43,9 |
| | P.2020. | 63,3 | 7,53 | 0,00 | 4050 | 1237,0 | 1489,6 | 245,1 | 0,62 | 28,28 | 0,0 | 21 | 2,5 | 1,6 | 43,2 |
| | J.2020. | 53,9 | 8,09 | 4,19 | 290 | 9,1 | 85,1 | 35,9 | 1 | 3,20 | 0,0 | 2,3 | 1,3 | 1,5 | 43,0 |
| DAB | J.2019. | 12,9 | 7,2 | 0,40 | 839 | 27,0 | 3,2 | 114,0 | 4,40 | 2,2 | 4,0 | 3 | 11,1 | 15,8 | 30,7 |
| | P.2020. | 13,9 | 7,21 | 0,80 | 840 | 25,2 | 8,6 | 105,9 | 0,11 | 0,72 | 0,0 | <1 | 18,3 | 18,8 | 31,9 |
| | J.2020. | 13,2 | 7,36 | 0,72 | 604 | 27,0 | 10,7 | 105,5 | 0,66 | 2,10 | 1,9 | 1,9 | 17,3 | 0,52 | 30,9 |
| IST | J.2019. | 25 | 6,91 | 0,24 | 2750 | 282,8 | 442,2 | 126,5 | 0,43 | 0,9 | 0,0 | <1 | 136,4 | 3,8 | 20,9 |
| | J.2020. | 17,6 | 7,15 | 6,50 | 968 | 467,5 | 592,5 | 0,048 | 5,10 | 0,40 | 0,1 | <1 | 117,1 | 49,5 | 18,9 |
| IVD | J.2019. | 46,3 | 7,07 | 3,70 | 572 | 14,7 | 1,7 | 66,4 | 0,67 | 0,3 | 0,0 | <1 | 50,0 | 0,44 | 40,1 |
| | P.2020. | 43,9 | 7,13 | 3,70 | 569 | 13,5 | 1,5 | 60,8 | 90,84 | 0,11 | 0,3 | <1 | 54,1 | 0,44 | 39,5 |
| | J.2020. | 40,0 | 7,28 | 5,10 | 708 | 13,1 | 1,4 | 65,5 | 0,20 | 0,11 | 0,2 | <1 | 51,9 | 0,04 | 39,5 |
| SJA | J.2019. | 24,5 | 7,15 | 6,60 | 550 | 3,0 | 1,7 | 75,0 | 0,15 | 0,0 | 3,8 | 1 | 12,0 | <0.01 | 13,0 |
| | P.2020. | 24,3 | 7,17 | 6,30 | 550 | 3,2 | 2,7 | 70,6 | 0,14 | 0,02 | 1,0 | <1 | 9,5 | <0.01 | 13,6 |
| | J.2020. | 23,7 | 7,35 | 6,80 | 500 | 2,9 | 1,7 | 80,1 | 0,30 | 0,01 | 1,6 | <1 | 9,3 | <0.01 | 13,4 |
| JEZ | P.2020. | 38,7 | 6,88 | 0,03 | 580 | 8,3 | 5,1 | 67,6 | 0,09 | 0,0 | 1,3 | <1 | 20,1 | 0,02 | 24,2 |
| | J.2020. | 38,7 | 6,91 | 0,02 | 581 | 8,6 | 4,7 | 55,8 | 0,20 | 0,01 | 1,1 | <1 | 18,7 | 0,04 | 24,7 |

| Oznaka geotermalnog lokaliteta | Sezona | T (°C) | pH | O ₂ (mg/L) | EC (µS/cm) | Na ⁺ (mg/L) | Cl ⁻ (mg/L) | DIC (mg/L) | DOC (mg/l) | NH ₄ ⁺ (mg/L) | NO ₃ ⁻ (mg/L) | TN (mg/L) | SO ₄ ²⁻ (mg/L) | H ₂ S (mg/L) | SiO ₂ (mg/L) |
|--------------------------------------|---------|--------|------|--------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------|---------------|--|--|--------------|---|----------------------------|----------------------------|
| KRA | J.2019. | 41,8 | 7 | 0,14 | 509 | 8,7 | 1,7 | 60,8 | 0,12 | 0,1 | 0,0 | <1 | 35,0 | 0,08 | 25,2 |
| | P.2020. | 42,2 | 6,99 | 0,01 | 508 | 8,7 | 2,6 | 54,9 | 0,11 | 0,13 | 1,0 | <1 | 36,9 | 0,08 | 23,5 |
| | J.2020. | 42,0 | 7,01 | 0,02 | 512 | 8,5 | 1,6 | 65,2 | 0,33 | 0,11 | 0,7 | <1 | 35,0 | 0,04 | 23,4 |
| LIP | J.2019. | 60 | 6,59 | 0,00 | 3720 | 806,8 | 596,0 | 218,9 | 3,50 | 8,4 | 2,0 | 9 | 275,9 | 0,02 | 51,3 |
| | P.2020. | 60 | 6,75 | 0,00 | 3770 | 735,5 | 604,7 | 158,8 | 0,13 | 8,82 | 0,0 | 7,5 | 320,7 | 0,04 | 49,4 |
| | J.2020. | 52,7 | 7,65 | 4,86 | 5829 | 902,7 | 627,2 | 278,5 | 31,70 | 7,65 | 0,0 | 5,5 | 309,0 | 0,04 | 51,4 |
| D1D | J.2019. | 44,5 | 6,82 | 0,80 | 591 | 13,5 | 1,6 | 65,1 | 0,40 | 0,3 | 0,0 | <1 | 48,4 | 0,02 | 39 |
| | P.2020. | 45,8 | 6,77 | 0,08 | 591 | 13,2 | 2,1 | 64,7 | 0,23 | 0,38 | 0,0 | <1 | 52,5 | 0,01 | 40,0 |
| | J.2020. | 42,5 | 6,97 | 0,33 | 778 | 13,0 | 1,4 | 65,5 | 0,10 | 0,28 | 0,0 | <1 | 50,0 | 0,04 | 40,1 |
| STU | J.2019. | 56,9 | 6,72 | 0,00 | 632 | 27,3 | 4,6 | 62,8 | 0,38 | 0,2 | 3,4 | 1,5 | 91,4 | 3,6 | 40,7 |
| | J.2020. | 55,0 | 6,67 | 0,00 | 637 | 25,7 | 10,5 | 70,5 | 0,24 | 0,25 | 0,1 | <1 | 93,8 | 0,44 | 41,0 |
| SVM | J.2019. | 36,4 | 6,8 | 0,05 | 10950 | 2843,0 | 2299,3 | 780,2 | 22,50 | 23,8 | 29,9 | 26 | 6,1 | 1,8 | 23,7 |
| | J.2020. | 36,1 | 7,09 | 0,00 | 10800 | 2717,9 | 2468,8 | 1000,1 | 28,50 | 20,85 | 6,4 | 16,4 | 1,8 | 1,9 | 26,4 |
| TOP | J.2019. | 64,8 | 6,76 | 0,00 | 627 | 18,7 | 10,6 | 52,9 | 0,13 | 0,3 | 0,0 | <1 | 104,9 | 1,2 | 43,5 |
| | P.2020. | 62,5 | 6,6 | 0,00 | 629 | 18,6 | 20,3 | 52,9 | 0,07 | 0,40 | 0,0 | <1 | 122,0 | 1,2 | 43,1 |
| | J.2020. | 64,7 | 6,5 | 0,00 | 631 | 18,9 | 21,1 | 53,2 | 0,60 | 0,34 | 0,9 | <1 | 113,9 | 2,5 | 41,9 |
| TUH | J.2019. | 32,1 | 6,99 | 0,08 | 533 | 7,5 | 1,5 | 74,1 | 0,13 | 0,2 | 0,0 | <1 | 31,5 | 0,48 | 20,9 |
| | P.2020. | 32,3 | 6,99 | 0,07 | 603 | 7,0 | 2,1 | 70,6 | 0,11 | 0,22 | 1,4 | <1 | 32,5 | 0,48 | 19,8 |
| | J.2020. | 32,4 | 6,97 | 0,02 | 604 | 7,0 | 1,3 | 78,2 | 0,11 | 0,20 | 1,3 | <1 | 31,2 | 0,48 | 20,3 |
| VAR | J.2019. | 58,1 | 6,32 | 0,00 | 1160 | 97,7 | 52,0 | 101,0 | 0,13 | 0,8 | 4,6 | 3 | 153,8 | 12 | 53,0 |
| | P.2020. | 59 | 6,4 | 0,00 | 1161 | 92,4 | 105,9 | 68,6 | 0,07 | 0,92 | 0,1 | <1 | 179,2 | 12 | 51,4 |
| | J.2020. | 56,7 | 6,27 | 0,00 | 1172 | 95,9 | 109,7 | 100,5 | 0,72 | 0,77 | 1,9 | <1 | 167,4 | 12 | 105,3 |
| ZGB | J.2019. | 80 | 6,52 | 0,00 | 2510 | 537,5 | 195,2 | 175,0 | 13,79 | 6,9 | 5,4 | 6,5 | 345,6 | 0,8 | 67,0 |
| | J.2020. | 78,8 | 6,43 | 0,00 | 2480 | 638,1 | 460,1 | 159,5 | 25,1 | 3,3 | 3,78 | 4,2 | 418,8 | 0,2 | 67,7 |

| Oznaka geotermalnog lokaliteta | Sezona | T (°C) | pH | O₂ (mg/L) | EC (μS/cm) | Na⁺ (mg/L) | Cl⁻ (mg/L) | DIC (mg/L) | DOC (mg/l) | NH₄⁺ (mg/L) | NO₃⁻ (mg/L) | TN (mg/L) | SO₄²⁻ (mg/L) | H₂S (mg/L) | SiO₂ (mg/L) |
|---|---------------|---------------|-----------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|--|--|----------------------|---|----------------------------------|-----------------------------------|
| ZGM | J.2019. | 79,6 | 6,85 | 0,00 | 2450 | 528,6 | 191,5 | 188,3 | 19,05 | 6,8 | 5,1 | 6,5 | 247,7 | 0,4 | 68,4 |
| | J.2020. | 78 | 7,39 | 0,00 | 2530 | 644,2 | 465,3 | 168 | 25,2 | 3,3 | 2,6 | 3,2 | 420,1 | 0,2 | 62,9 |
| KRE | J.2019. | 45,1 | 8,13 | 0,90 | 840 | 200,2 | 9,4 | 145,0 | 4,32 | 8,1 | 0,0 | 6,3 | 60,7 | 2,4 | 31,8 |
| | P.2020. | 45 | 8,02 | 0,20 | 840 | 193,2 | 3,9 | 98,0 | 1,88 | 9,03 | 0,0 | 6,4 | 24,3 | 2,4 | 30,5 |
| | J.2020. | 39,5 | 8,28 | 5,19 | 523 | 202,5 | 2,9 | 115,5 | 1,30 | 7,66 | 1,3 | 5,8 | 21,9 | 0,48 | 31,2 |



Slika 9. Korelacijska analiza na bazi Pearson koeficijenta na normaliziranom setu podataka fizikalno - kemijskih parametara.

4.1.2. Sastav i raznolikost prokariotske mikrobne zajednice u geotermalnim vodama Hrvatske

Za utvrđivanje strukture i prostorno-vremenske dinamike prokariotske mikrobne zajednice u 19 geotermalnih izvora i bušotina Hrvatske, 16S rRNA dijelovi gena bakterija i arheja su sekvencirani iz 51. prikupljenog uzorka na svim lokalitetima tijekom tri sezone.

Sekvenciranje je rezultiralo ukupnim brojem od 607 834 očitavanja koja su grupirana u 17 162 ASV-a. Nakon filtriranja, konačni „phyloseq“ objekt sadržavao je taksonomsku tablicu sa 2065 svojti u 51. uzorku te je isti korišten za daljnje statističke analize. Nakon filtriranja, najveći broj očitavanja zabilježen je u ZGB (jesen 2020., n = 17718), a uzorak s najmanjim brojem očitavanja bio je DAB (jesen 2020., n = 1329). Prije procjene alfa raznolikosti, podaci su svedeni na brojčano isti skup podataka onog uzorka s najnižim očitanjem (DAB, n = 1391) na nefiltriranom setu podataka.

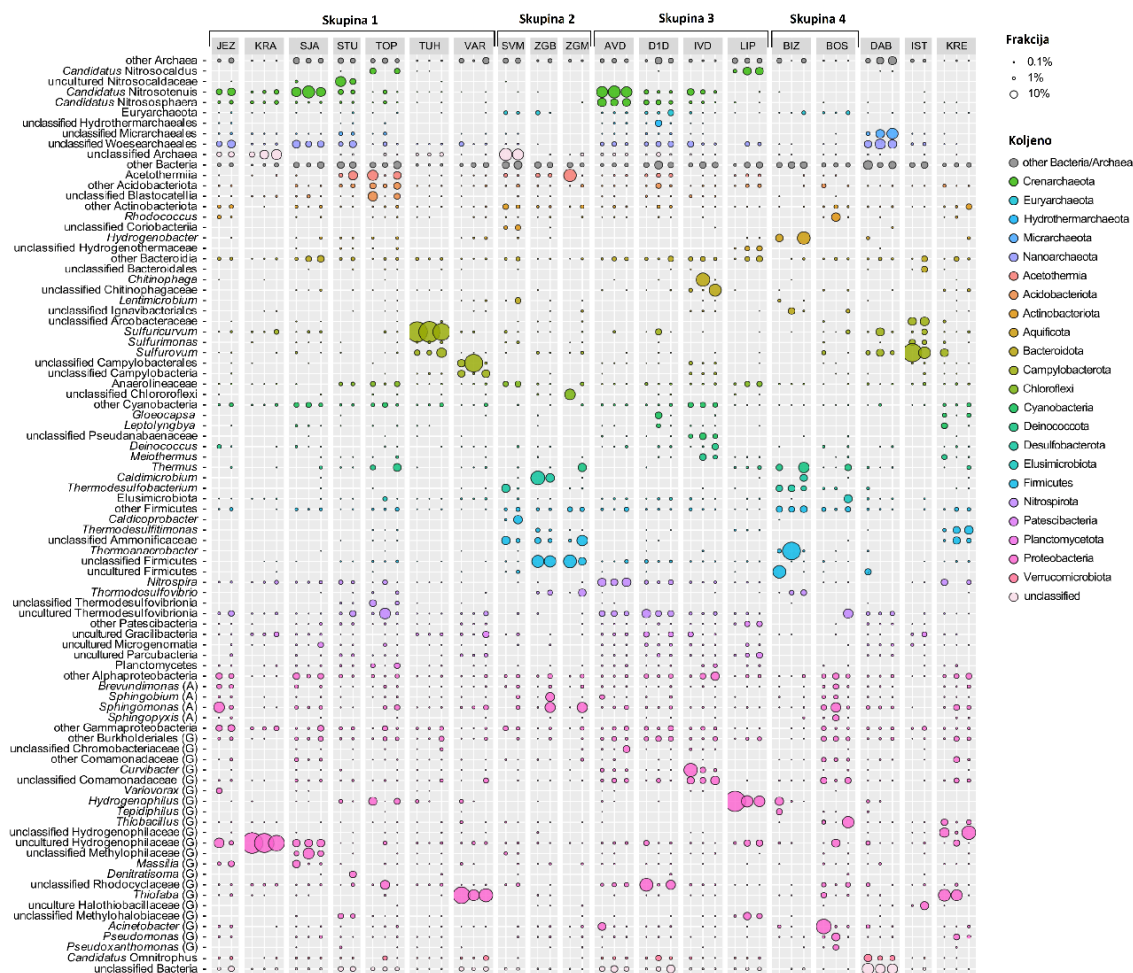
Sastav prokariotske mikrobne zajednice karakteriziran je kao relativno različit (tj. specifičan po mjestu uzorkovanja) u geotermalnim bušotinama i izvorima (Slika 10, Prilog 2)

sa umjerenom i promjenjivom složenosti (veliko bogatstvo različitih vrsta/ASV-eva, Slika 11). U većini slučajeva utvrđena je vremenska stabilnost fizikalno-kemijskih parametara i prokariotske mikrobne zajednice, kao što je prikazano klasteriranjem lokaliteta po sezonskim uzorkovanjima (Slika 12). Također, Shannonov i Simpsonov indeks raznolikosti ukazali su na varijabilnost alfa raznolikosti na uzorkovanim lokalitetima (Slika 11).

U 19 različitih geotermalnih izvora i bušotina utvrđena je prisutnost 21 koljena s prosječnom relativnom zastupljenosti $> 1\%$ (Slika 10, Prilog 2) od kojih su 4 koljena pripadala predstavnicima arheja: Aenigmarchaeota, Crenarchaeota, Micrarchaeota i Nanoarchaeota. Koljeno Proteobacteria prisutno je u 24 uzorka kao dominantno, a nakon njega slijede koljena Campylobacterota (7) i Crenarchaeota (4). Ponekad predstavnici ovih navedenih koljena nisu bili dominantni, no skupa sa predstavnicima Bacteroidota, Firmicutes, Nitrospirota i Cyanobacteria bili su često zastupljeni u uzorcima ovih geotermalnih voda.

Najjedinstveniji i najrazličitiji sastav zajednice bio je karakterističan za uzorke prikupljene u Đakovačkoj Breznici (DAB) gdje je dosta pronađenih ASV-eva pripalo još uvijek slabo proučenim redovima arheja Micrarchaeales (koljeno Micrarchaeota) i Woeseearchaeales (koljeno Nanoarchaeota) koji su činili 28 %, odnosno 25 % utvrđene mikrobne zajednice. Dok su ovi ASV-evi arheja također uočeni i na drugim uzorkovanim lokalitetima (Slika 10, Prilog 2), njihova vrlo visoka relativna zastupljenost bila je jedinstvena za DAB.

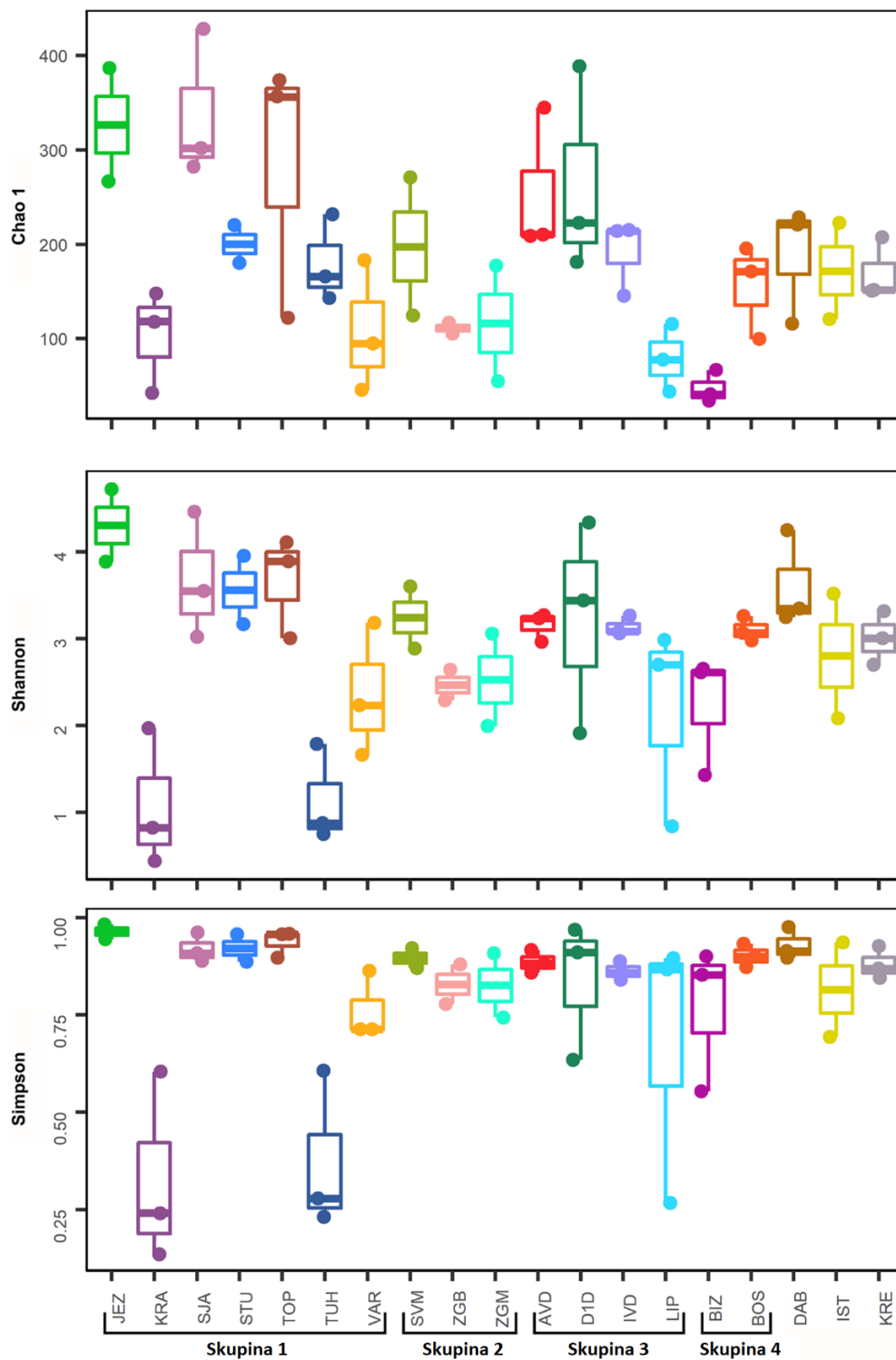
Visoka relativna zastupljenost ASV-eva arheja (7 – 47 %) također je uočena u geotermalnim uzorcima vode istočne Hrvatske koji pripadaju Skupini 3: AVD, D1D, IVD i LIP (Slika 10, Prilog 2), kao i na nekim lokalitetima u sjeverno-središnjem dijelu Hrvatske (Skupina 1, Slika 10, Prilog 2). Dok su Woeseearchaeales također otkriveni na ovim lokalitetima gdje su činili do ukupno 12 %, dominantne populacije arheja u ovim uzorcima bile su povezane s oksidacijom amonijaka (AOA) poput predstavnika obitelji Nitrosocaldaceae (zastupljene u LIP (Skupina 3, 60 °C)), STU (Skupina 1, 55 – 57 °C) i TOP (Skupina 1, 62.5 – 65 °C), Nitrosopumilaceae (rod *Candidatus Nitrosotenuis*, zastupljen u AVD (Skupina 3, 47 – 48 °C)), SJA (Skupina 1, 24 °C) i JEZ (Skupina 1, 39 °C) te Nitrososphaeraceae (zastupljene također u AVD (Skupina 3, 47 – 48 °C)) (Slika 10).



Slika 10. Sastav mikrobne zajednice grupiran na taksonomskoj razini koljena po vrsti vodonosnika gdje zastupljenost ASV-eva doseže relativnu brojnost od 5 % ili više u najmanje jednom uzorku. Svoje su obojene po pripadajućem koljenu, a razredi Proteobacteria naznačeni su pored niže taksonomske klasifikacije. Relativna brojnost neklasificiranih ASV-eva nije prikazana („unclassified”).

AVD predstavlja lokalitet s najvećom ukupnom zastupljenosti ASV-eva vezanih za AOA (34 – 39 %) te također ukazuje na neuobičajeno visoku zastupljenost ASV-eva povezanih s rodom *Nitrospira* (12 – 14 %, NOB / comammox) (Slika 10), dok su sekvence povezane s ovom skupinom bile puno manje zastupljene (do maksimalnih 7 %) na svim drugim mjestima uzorkovanja (Slika 10). Uzorci IST i TUH (Skupina 1) ukazali su na visoku relativnu brojnost ASV-eva povezanih sa sumpor-oksidirajućim bakterijama (SOB) poput predstavnika *Sulfurovum*, *Sulfurimonas* i *Sulfuricurvum* unutar koljena Campylobacterota (Slika 10). ASV-evi povezani s poznatim predstavnicima SOB unutar Gammaproteobacteria (rod *Thiobacillus* i drugi predstavnici obitelji Hydrogenophilaceae, kao i rod *Thiofaba* te drugi rodovi unutar Halothiobacillaceae), pojavili su se zajedno s predstavnicima SOB koljena Campylobacterota u VAR (Skupina 1), a njihova nešto veća zastupljenost zabilježena je u uzorcima KRA (Skupina 1), LIP (Skupina 3), BIZ (Skupina 4) i KRE (Slika 10). Zanimljivo je da su SOB pronađene u DAB, ali nisu bile dominantne (Slika 10) unatoč utvrđenoj vrlo visokoj koncentraciji sulfida na tom lokalitetu (Tablica 12). Međutim, neuobičajeno velik broj očitavanja prisutnih u DAB, identificirano je kao ASV-evi bakterija, no nisu se mogli dalje taksonomski klasificirati.

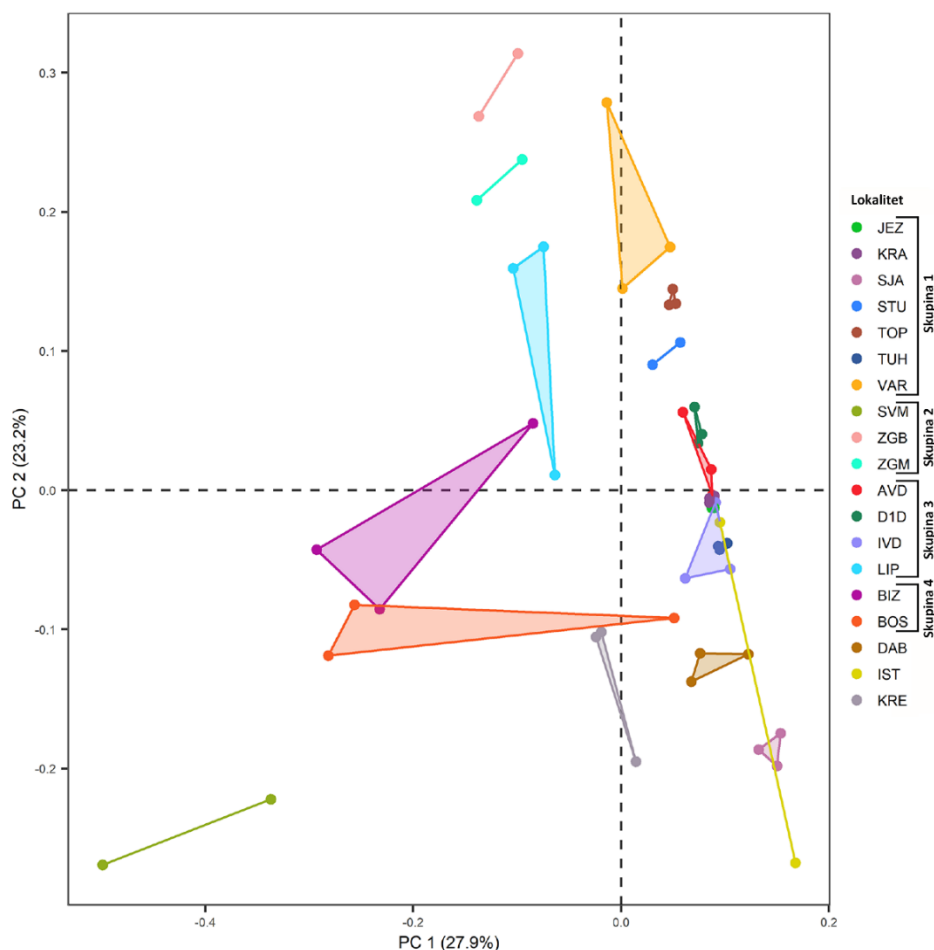
Iako su otkriveni u mnogim uzorcima, ASV-evi koji se odnose na dobro poznate termofile (različitih taksonomskih kategorija - Thermotoga, Deinococcota, Aquificota i Thermoplasmatota) nisu bili pretjerano zastupljeni u istraženim geotermalnim vodama Hrvatske s visokom temperaturom (> 60 °C), osim u BIZ (Skupina 4) gdje su Aquificota i Deinococota činili polovicu zabilježene mikrobne zajednice tijekom proljeća 2020. godine (Slika 10, Prilog 2). U uzorcima geotermalnih voda u kojima ne dominiraju AOA ili SOB (BOS, D1D, IVD, JEZ, SVM, ZGB i ZGM), prokariotske mikrobne zajednice bile su raznolike i specifične za mjesto uzorkovanja, a sastojale su se od različitih ASV-eva koji pripadaju mezofilnim, termotolerantnim i termofilnim, aerobnim, sulfat-reducirajućim (SRB) ili fermentativnim heterotrofima (Slika 10, Prilog 2).



Slika 11. Indeksi alfa raznolikosti (gornji graf: bogatstvo vrsta (Chao1); srednji graf: Shannon indeks raznolikosti; donji graf: Simpson indeks raznolikosti) za svako mjesto uzorkovanja po vrsti vodonosnika, na temelju svih prikupljenih sezonskih uzoraka.

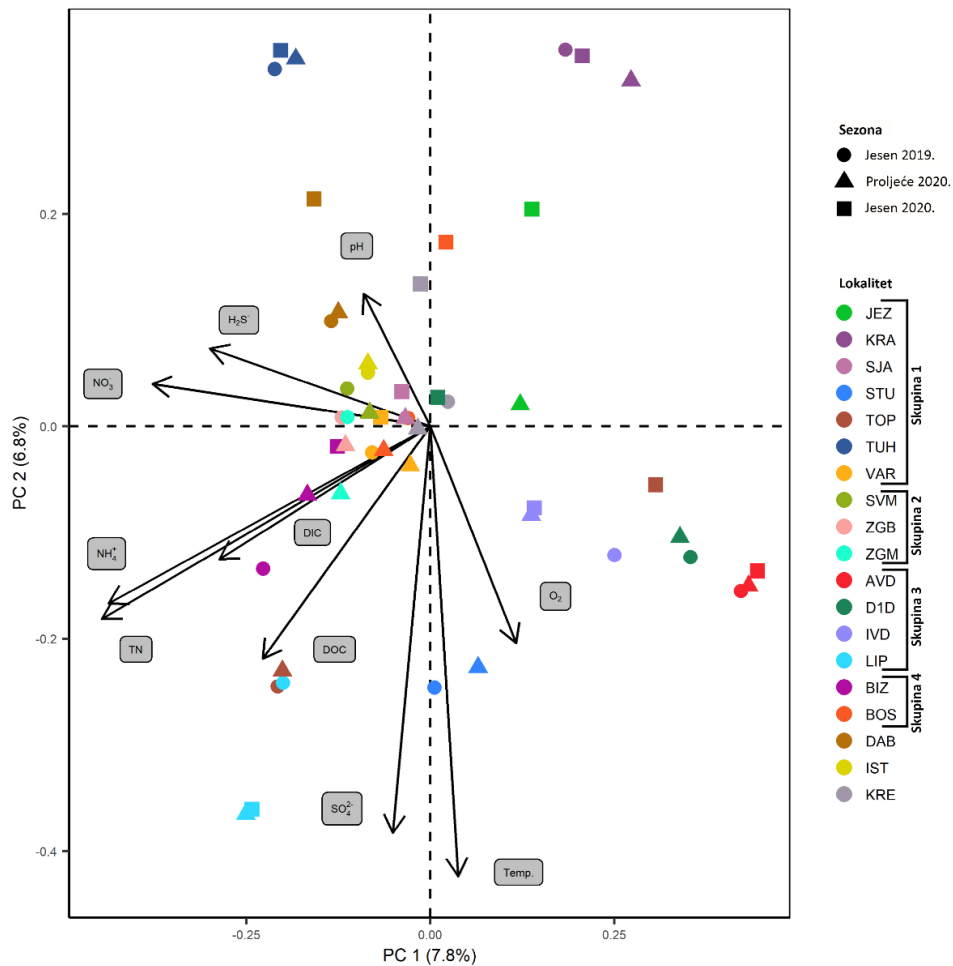
4.1.3. Utjecaj mjesta i sezone uzorkovanja, vrste vodonosnika te fizikalno-kemijskih parametara na sve istraživane geotermalne vode u Hrvatskoj

PCA napravljena na glavnim izmjerenim fizikalnim parametrima (temperatura i pH) i na utvrđenim koncentracijama kemijskih parametara (DIC, DOC, O₂, H₂S, SO₄²⁻, NH₄⁺, NO₃⁻, TN i SiO₂) ukazao je na odvajanje uzoraka na temelju mjesta uzorkovanja, a ne sezone uzorkovanja ili vrste geotermalnog vodonosnika (Slika 12). Iako je jasno specifično odvajanje po uzorkovanom lokalitetu, visok stupanj stabilnosti fizikalno-kemijskih parametara karakterističan je za većinu uzoraka geotermalne vode, osim za dva uzorka iz IST (Slika 12) koji su bili jako različiti.



Slika 12. PCA grupiranje uzoraka geotermalne vode na temelju glavnih izmjerenih fizikalnih (temperatura i pH) i kemijskih (DIC, DOC, O₂, H₂S, SO₄²⁻, NH₄⁺, NO₃⁻, TN i SiO₂ koncentracija) parametara. Točke su uzorci prikupljeni tijekom dvije ili tri sezone uzorkovanja i obojeni prema mjestu uzorkovanja.

PERMANOVA statističkim testom pokazano je da mjesto uzorkovanja ima značajan utjecaj na oblikovanje mikrobne zajednice prokariota ($p = 0,001$, $R^2 = 0,72241$) (Slika 13), dok su vrsta vodonosnika ($p = 0,001$, $R^2 = 0,23872$), kao i tip geotermalnog lokaliteta (izvor ili bušotina; $p = 0,001$, $R^2 = 0,04774$) imali manji, ali također značajan utjecaj. Statistički značajan utjecaj različitih sezona uzorkovanja na strukturu mikrobne zajednice prokariota nije utvrđen ($p = 0,738$, $R^2 = 0,03692$).



Slika 13. Analiza glavnih koordinata (PCoA) prokariotske mikrobne zajednice ograničene temperaturom, pH, koncentracijama SO_4^{2-} , H_2S , NH_4^+ , TN, NO_3^- , DIC i DOC. Točke su uzorci obojeni po mjestu i sezoni uzorkovanja. Polupravci predstavljaju značajan utjecaj ($p < 0,05$; PERMANOVA) izmjerenih i analiziranih okolišnih parametara na prokariotsku mikrobnu zajednicu.

Skupnom analizom svih analiziranih lokaliteta, većina ispitivanih fizikalno-kemijskih parametara ukazali su na manji, no ipak statistički značajan utjecaj ($p < 0,05$) (Tablica 13), a time i na moguće varijacije u sastavu prokariotske mikrobne zajednice (Slika 13).

Tablica 13. Vrijednosti PERMANOVA testa korištenog na mikrobnoj zajednici prokariota i okolišnim parametrima. Prikazani su parametri koji su pokazali statistički značajan utjecaj na oblikovanje mikrobne zajednice ($p < 0,05$).

| Varijabla 1 | Varijabla 2 | PERMANOVA stat R^2 | p |
|--------------------------------------|-------------------------------|----------------------|-------|
| Mikrobna zajednica prokariota | Temp. | 0.04746 | 0.001 |
| | pH | 0,03382 | 0,001 |
| | O ₂ | 0,03273 | 0,007 |
| | NH ₄ ⁺ | 0,04678 | 0,001 |
| | NO ₃ ⁻ | 0,03701 | 0,001 |
| | TN | 0,04664 | 0,001 |
| | H ₂ S | 0,03823 | 0,001 |
| | SO ₄ ²⁻ | 0,04064 | 0,001 |
| | DIC | 0,03219 | 0,001 |
| | DOC | 0,03316 | 0,005 |

4.1.4. Oblikovanje mikrobne zajednice prokariota prema fizikalno-kemijskim parametrima unutar različitih skupina vodonosnika

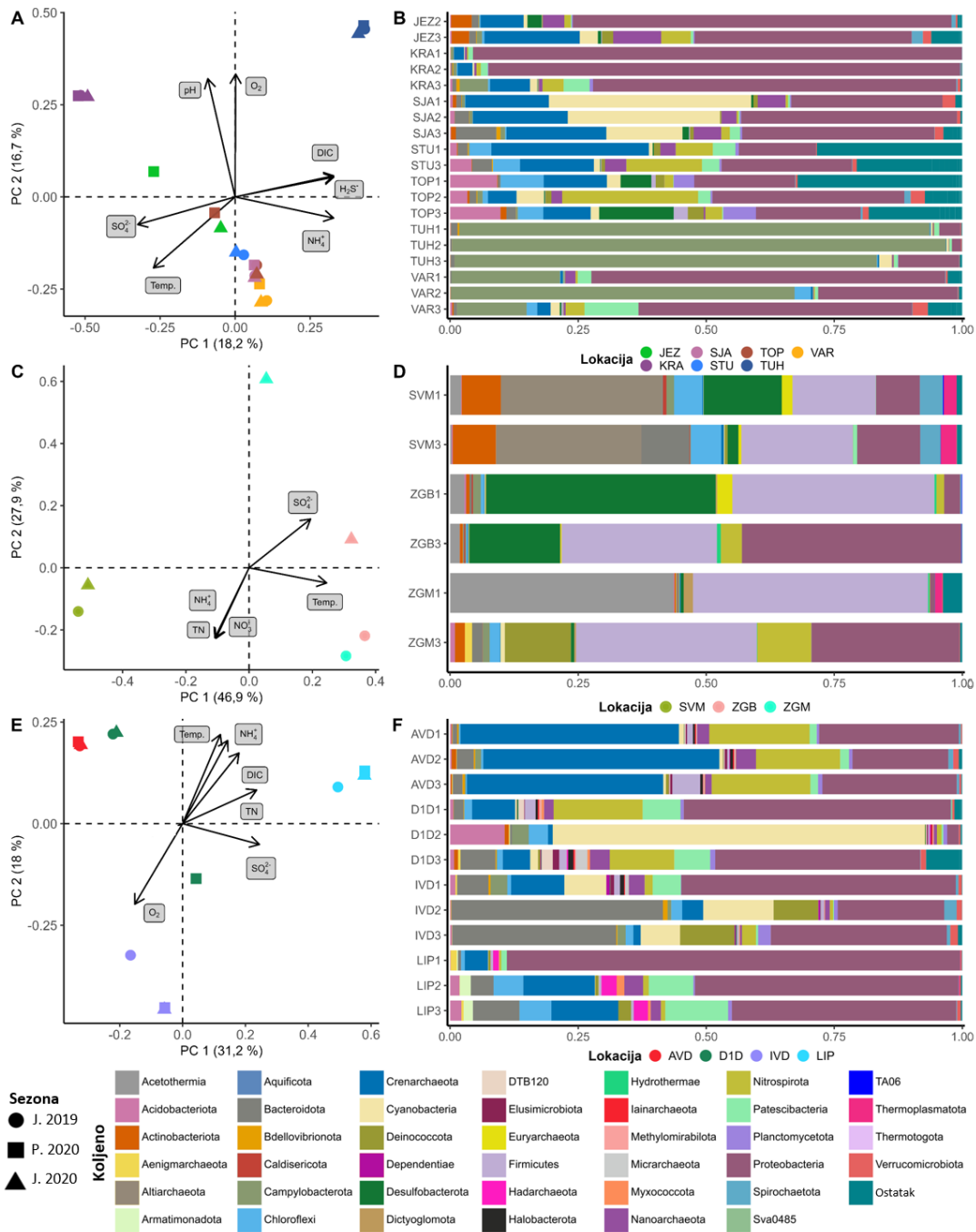
Posebno su proučavane razlike u sastavu zajednice prokariota i abiotičkih parametara za svaku skupinu vodonosnika, budući da su se zajednice donekle razlikovale. Neki od analiziranih parametara imali su veliki utjecaj na sastav i oblikovanje mikrobne zajednice što se vidi po podjeli prema vrsti vodonosnika (Slika 14 A-F, Slika 15 A-D). Uzorci su, kao i u prethodnom prikazu grupirani prema lokaciji (Slika 12, Slika 13, Slika 14 A, C, E, Slika 15 A, C), više nego prema vrsti vodonosnika ili sezoni uzorkovanja što je dodatno ukazalo na razlike u sastavu mikrobne zajednice svakog lokaliteta.

Temperatura je bila glavni odgovorni faktor za oblikovanje prokariotske zajednice gotovo svih skupina vodonosnika: Skupine 1, Skupine 2 i Skupine 3, dok je pH vrijednost imala značajan

utjecaj na Skupinu 1. Pojedini spojevi sumpora i dušika u kombinaciji, snažno su utjecali na razvoj prokariota unutar Skupine 1, Skupine 2 i Skupine 3 (Tablica 14). Nijedan od analiziranih parametara nije značajno utjecao na oblikovanje prokariotske zajednice unutar lokaliteta koji pripadaju Skupini 4 ($p > 0,05$).

Tablica 14. Vrijednosti PERMANOVA testa korištenog na okolišnim parametrima i mikrobnoj zajednici prokariota podijeljenoj u skupine prema vrsti vodonosnika. Prikazani su parametri koji su pokazali statistički značajan utjecaj na oblikovanje mikrobne zajednice ($p < 0,05$).

| Varijabla 1 | Varijabla 2 | PERMANOVA stat R^2 | p |
|---|-------------------------------|----------------------|---------|
| Mikrobna zajednica Skupine 1 | Temp. | 0,12756 | 0,002 |
| | pH | 0,13112 | 0,001 |
| | O ₂ | 0,14283 | 0,002 |
| | NH ₄ ⁺ | 0,1357 | 0,003 |
| | DIC | 0,10266 | 0,014 |
| | H ₂ S | 0,14063 | 0,001 |
| | SO ₄ ²⁻ | 0,13419 | 0,001 |
| Mikrobna zajednica Skupine 2 | Temp. | 0,35772 | 0,0166 |
| | NH ₄ ⁺ | 0,34969 | 0,03056 |
| | NO ₃ ⁻ | 0,259 | 0,01667 |
| | TN | 0,33376 | 0,02778 |
| | SO ₄ ²⁻ | 0,34678 | 0,0278 |
| Mikrobna zajednica Skupine 3 | Temp. | 0,23204 | 0,004 |
| | O ₂ | 0,29086 | 0,002 |
| | NH ₄ ⁺ | 0,29165 | 0,003 |
| | TN | 0,27625 | 0,006 |
| | DIC | 0,25837 | 0,003 |
| | SO ₄ ²⁻ | 0,294 | 0,001 |

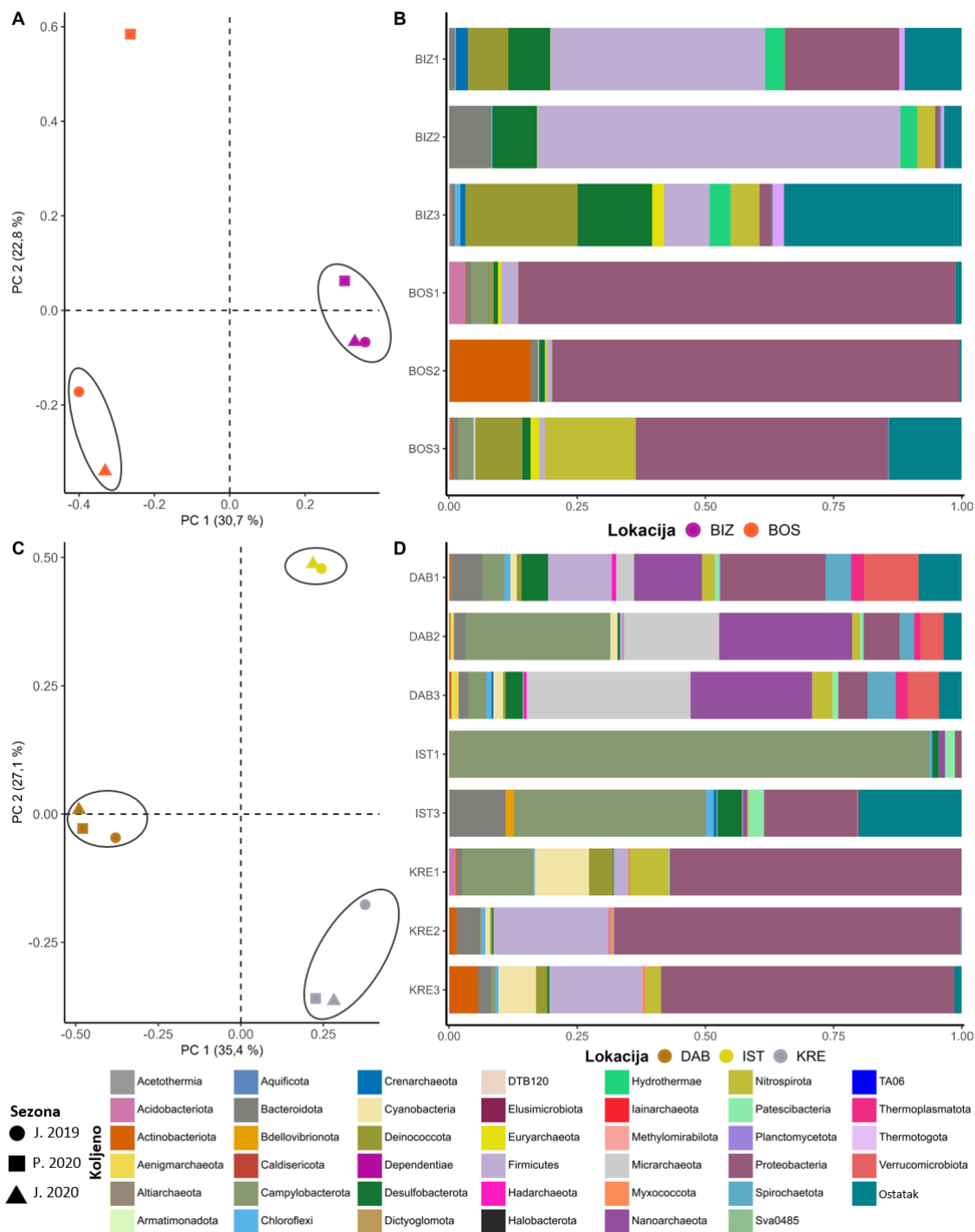


Slika 14. Prikaz PCoA grupiranja lokaliteta prema vrsti vodonosnika (A, C, E). Oblici su uzorci obojeni po mjestu i sezoni uzorkovanja. Polupravci predstavljaju značajan utjecaj ($p < 0,05$) okolišnih parametara na zajednicu prokariota. Slike B, D i F prikazuju relativnu zastupljenost prokariota po vrsti vodonosnika na razini koljena. Distribucija vrsta je procijenjena prosječnom relativnom brojnošću većom od 1 % prilikom čega su ostali mikroorganizmi s relativnom brojnošću manjom od 1 % klasificirani kao „Ostatak“.

Grafovi relativne zastupljenosti po vodonosnicima pokazali su dodatne sličnosti u sastavu prokariota u nekim uzorcima koji pripadaju istoj vrsti vodonosnika (posebno Skupina 3; TUH i VAR (Skupina 1); SVM i ZGB (Skupina 2)) (14 B, D i F). Unatoč dominaciji Proteobacteria, mikrobna zajednica je na nekim lokalitetima bila očito drugačija (kao što je KRA i TUH (Skupina 1)) od ostalih lokacija koje pripadaju istoj skupini vodonosnika, što ukazuje na mogući drugačiji utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na oblikovanje prokariotske zajednice (14 B).

Nakon Proteobacteria i Campylobacterota, ostali dominantni predstavnici su Crenarchaeota i Firmicutes s različitim utjecajima okolišnih parametara na svakom lokalitetu uzorkovanja (Slika 14). Zanimljivo otkriće bila je prisutnost cijanobakterija karakteristična za SJA tijekom svih sezona uzorkovanja i za lokalitet D1D u proljeće 2020 (Slika 14 B, F). Općenito, Skupinu 2 karakterizirala je visoka relativna brojnost predstavnika koljena Firmicutes, dok je dominantnost koljena Proteobacteria, Acetothermia i Desulfobacterota (SRB) bila specifična za sezonu, a predstavnici Altiarchaeota specifični za lokalitet SVM (Slika 14 D). Za AVD nije uočeno postojanje prostorno-vremenskih razlika, dok je IVD pokazao porast predstavnika koljena Bacteroidota u dvije sezone uzorkovanja (Slika 14 F).

U Skupini 4 dominirali su predstavnici Proteobacteria i Firmicutes što je uzrokovalo jasno odvajanje uzoraka ova dva lokaliteta, kao što je i vidljivo na PCoA grafu (Slika 15 A, B). Posebno se ističe struktura mikrobne zajednice prokariota lokaliteta BOS tijekom proljetne sezone uzorkovanja (15 B). S druge strane, kao što se očekivalo, lokaliteti DAB, IST i KRE ukazali su na međusobne razlike u relativnoj zastupljenosti pojedinih predstavnika te nisu pokazali nikakvo specifično grupiranje. Osim toga, ukazali su na visoku vremensku stabilnost s minimalnim promjenama u strukturi zajednice (Slika 15 C, D).



Slika 15. Prikaz PCoA grupiranja lokaliteta prema vrsti vodonosnika (A i C). Oblici su uzorci obojeni po mjestu i sezoni uzorkovanja. Slike B i D prikazuju relativnu zastupljenost prokariota po vrsti vodonosnika na razini koljena. Distribucija vrsta je procijenjena prosječnom relativnom brojnošću većom od 1 % prilikom čega su ostali mikroorganizmi s relativnom brojnošću manjom od 1 % klasificirani kao „Ostatak“.

4.1.5. Moguće metaboličke funkcije identificiranih prokariota

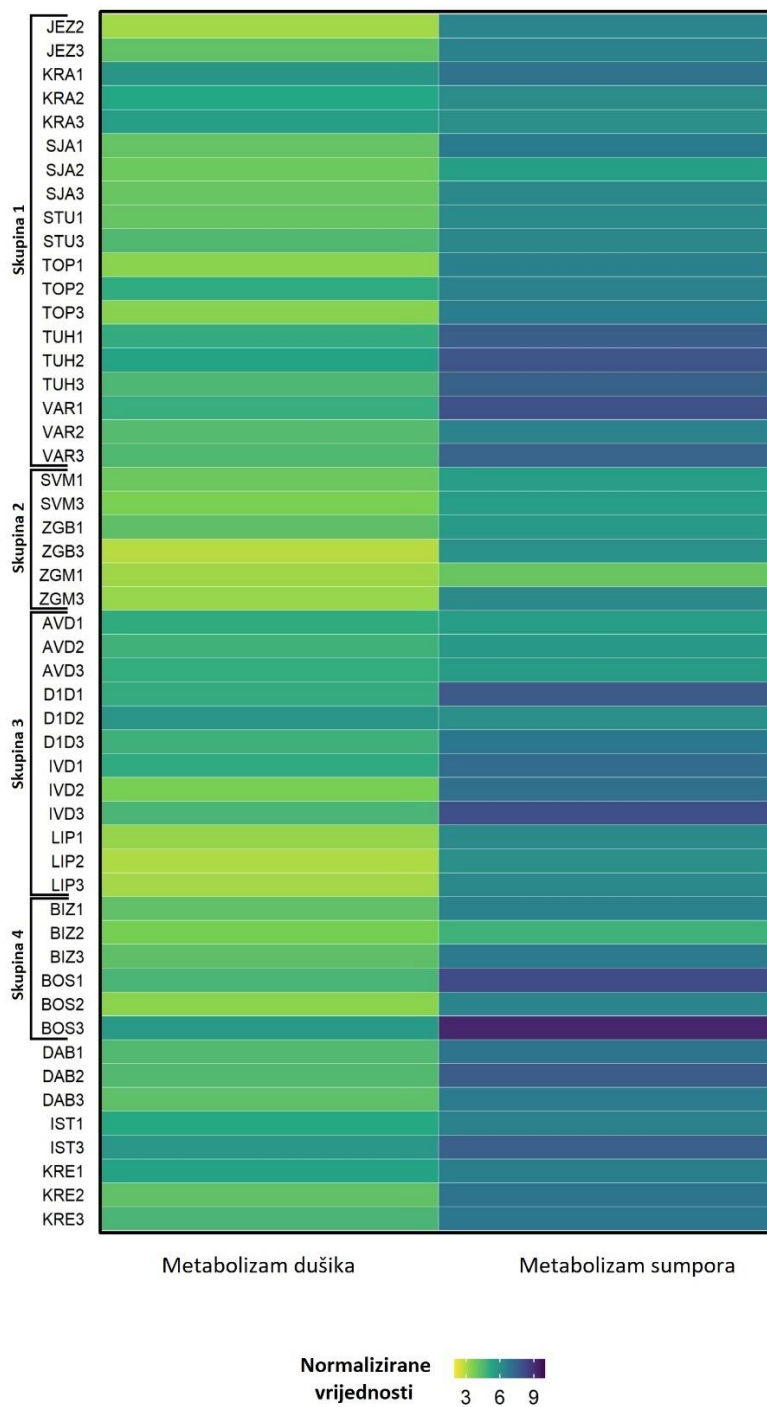
Korištenje Tax4Fun analize za neovisno predviđanje funkcionalnog potencijala prokariotske mikrobne zajednice na temelju povezanosti identificiranih ASV-eva s mikroorganizmima koji imaju već od prije poznat metabolički potencijal, pokazalo je da su rezultati ove analize u skladu s gore opisanim rezultatima relativne zastupljenosti i utjecaja abiotičkih faktora (Slika 16). Funkcionalnim predviđanjem pretpostavljena je dominacija gena mikroorganizama blisko povezanih sa svojstama za koje se dosad zna da sudjeluju u oksidaciji i redukciji sumpornih i dušikovih spojeva (Slika 16).

Na onim lokalitetima koji su bili pod utjecajem kombinacije spojeva i sumpora i dušika, Tax4Fun analizom pretpostavljeno je da dominantne svojte sadržavaju gene povezane s reakcijama u oba metabolizma. Drugim riječima, pretpostavljena zastupljenost gena povezanih s oba metabolizma odgovara lokalitetima gdje je utvrđena značajna prisutnost mikroorganizama poput AOA, NOB, comammox ili SOB i SRB (Skupina 1, Skupina 3) (Slika 17, Prilog 3).

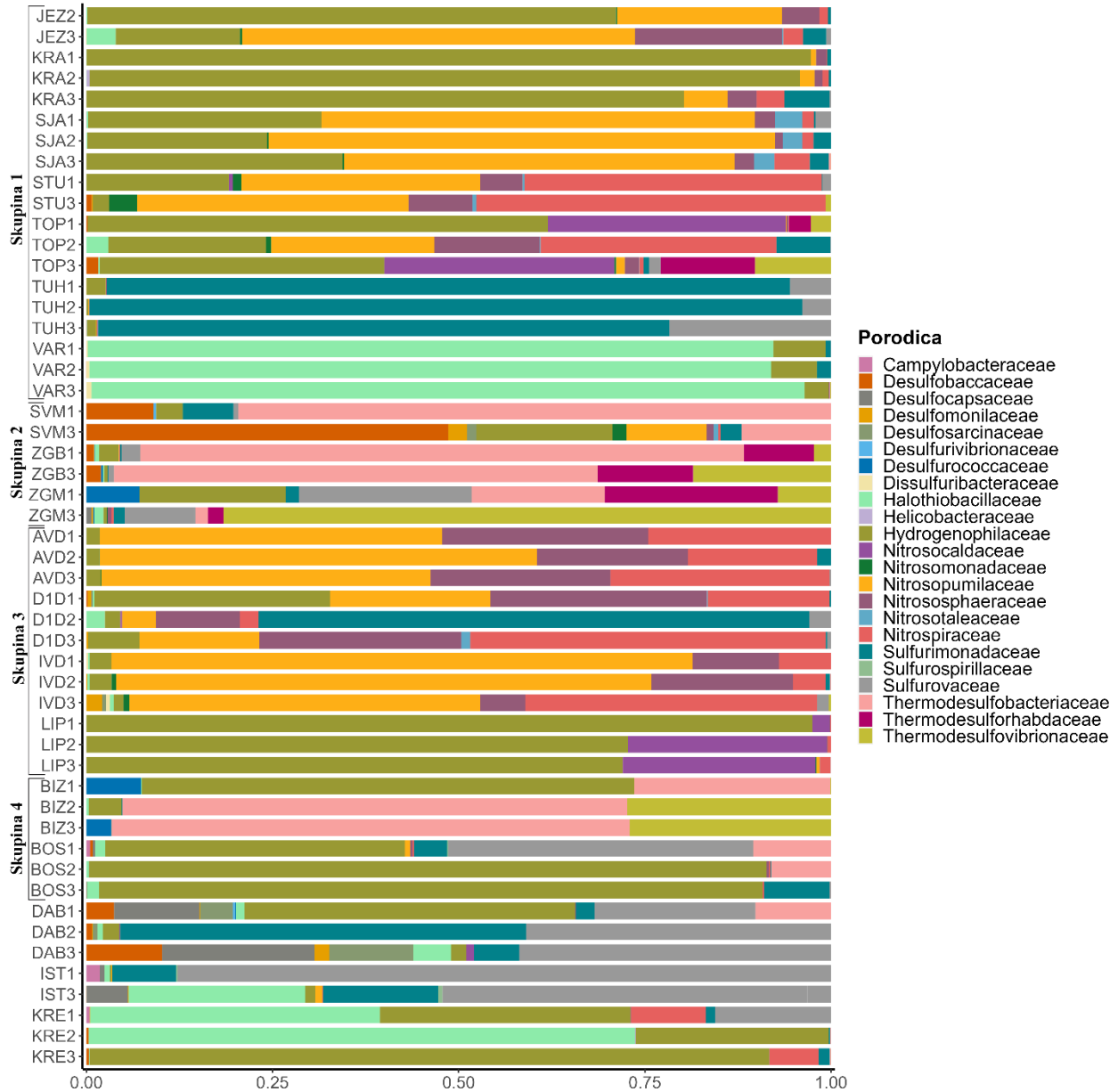
Funkcionalna analiza pokazala je da su Bošnjaci (BOS) imali najveći potencijal vezan uz metabolizam sumpora, posebice tijekom treće sezone uzorkovanja, što je potvrđeno dominacijom predstavnika Hydrogenophilaceae (SOB), ali i ostalih manje zastupljenih predstavnika vezanih za ciklus sumpora (Slika 17, Prilog 3). Osim BOS, lokaliteti unutar Skupine 1 poput TUH, VAR i KRA tijekom svih istraživanih sezona bili su karakterizirani konstantnom zastupljenosti predstavnika Halothiobacillaceae, Sulfurimonadaceae i Hydrogenophilaceae.

Pretpostavljeno postojanje gena s funkcijama vezanim uz metabolizam dušika, bili su najviše karakteristični za istraživane lokalitete Daruvarskih toplica (AVD, IVD, D1D; Skupina 3) i lokalitet STU (Skupina 1) zbog utvrđene dominacije AOA, NOB i comammox unutar identificiranih porodica Nitrosopumilaceae, Nitrososphaeraceae i Nitrospiraceae (Slika 17, Prilog 3).

Kao i u svakom drugom ekosustavu, zbog odvijanja normalnih životnih funkcija, ali i utvrđenih DIC i DOC koncentracija, očekivana je pretpostavka postojanja gena s funkcijama vezanih uz metabolizam ugljika, odnosno reakcije fiksacije ugljika, fotosinteza i razgradnja organske tvari.



Slika 16. Funkcionalno predviđanje mikrobnih zajednica prokariota u geotermalnim vodama Hrvatske po mjestu i sezoni uzorkovanja te vrsti vodonosnika temeljeno na Tax4Fun analizi. Vrijednosti su normalizirane prema broju kopija pretpostavljenih gena zbog usporedivosti i uvećani radi lakše vizualizacije.



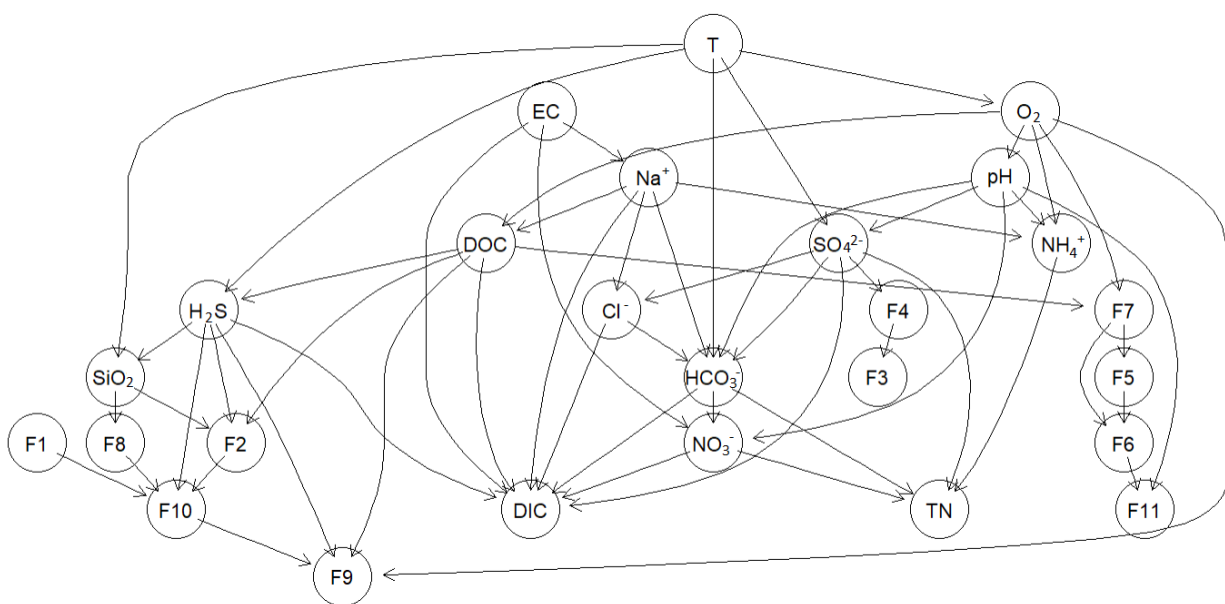
Slika 17. Sastav prokariotske mikrobne zajednice po mjestu uzorkovanja i vrsti vodonosnika gdje su ASV-evi grupirani na razini porodice prikazujući relativnu zastupljenost samo onih porodica koji sadržavaju oksidante amonijaka (AOA, AOB), nitrita (NOB), comammox organizme ili oksidante sumpora (SOB) i reducente sulfata (SRB), kao što je predviđeno Tax4Fun analizom.

4.1.6. Matematički modeli uzročnosti

Matematički model uzročnosti prikazao je vrlo kompleksnu, no objašnjivu i očekivanu mrežu interakcija. Na temelju DAG dijagrama prikazanog na Slici 18. parametar temperature jedan

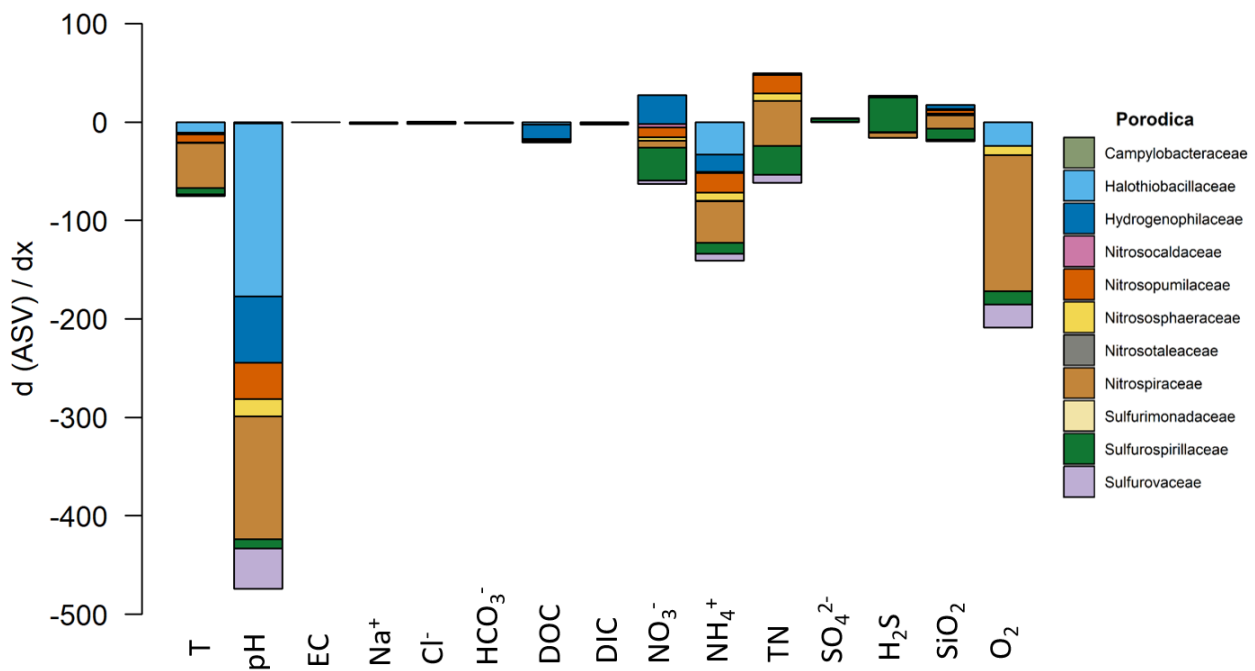
je od glavnih „roditeljskih“ varijabli koji direktno utječe na koncentraciju HCO_3^- , SO_4^{2-} , SiO_2 te očekivano, na koncentraciju O_2 . Rezultati utjecaja električne vodljivosti kao druge glavne „roditeljske“ varijable direktno su povezani s varijablama Na^+ i DIC, a neposredno i s varijablama Cl^- , HCO_3^- i DOC što upućuje na očekivanu kaskadu odgovora (Slika 18).

Na još jednu kaskadu odgovora ukazuju i nutrijenti, kao što su koncentracije NO_3^- i NH_4^+ koje očekivano utječu na parametar TN, a na koje su utjecaj imale pH vrijednosti u kombinaciji s koncentracijom O_2 i temperaturom. H_2S predstavlja jednu od kauzalnih varijabli porodicama F2 (Halothiobacillaceae) te F9 (Sulfurospirillaceae) i F10 (Sulfurovaceae) koje su, osim međusobno povezane, u konekciji i s F1 (Campylobacteraceae) i F8 porodicama (Sulfurimonadaceae). Koncentracije SO_4^{2-} predstavljale su kauzalnu varijablu porodici F4 (Nitrosocaldaceae) koja je imala utjecaj na razvitak porodice F3 (Hydrogenophilaceae). Međusobni učinak na razvitak pokazivale su i ostale porodice vezane za ciklus dušika poput F5 (Nitrosopumilaceae), F6 (Nitrososphaeraceae), F7 (Nitrosotaleaceae) i F11 (Nitrospiraceae) s koncentracijom O_2 , temperaturom i pH vrijednosti kao jednim od uzročnih faktora (Slika 18).



Slika 18. DAG dijagram s čvorovima mreže praćenih ($p < 0,05$) fizikalno-kemijskih parametara na porodice F1 – F10 (Campylobacteraceae=F1, Halothiobacillaceae=F2, Hydrogenophilaceae=F3, Nitrosocaldaceae=F4, Nitrosopumilaceae=F5, Nitrososphaeraceae=F6, Nitrosotaleaceae=F7, Sulfurimonadaceae=F8, Sulfurospirillaceae=F9, Sulfurovaceae=F10 i Nitrospiraceae=F11).

Detaljnijim proučavanjem kauzalnosti između prokariota i abiotičkih svojstava u geotermalnim vodama Hrvatske, uočeno je da je pH vrijednost imala najveće negativne kauzalne učinke na većinu zajednica (Slika 19), posebno na porodicu Halothiobacillaceae. Temperatura je imala negativan kauzalni efekt na porodicu Nitrospiraceae, baš kao i pH vrijednost te koncentracija NH_4^+ i O_2 . Pozitivni učinci temperature, pH vrijednosti, električne vodljivosti, Na^+ , Cl^- , HCO_3^- te DIC nisu uočeni. Očekivano, uočen je pozitivan kauzalni učinak H_2S na porodicu Sulfurospirillaceae te TN na porodicu Nitrosopumilaceae i Nitrososphaeraceae, a sve tri porodice veže negativan utjecaj pH vrijednosti. Kod drugih porodica vezanih za ciklus N, odnosno S, učinak dušikovih, odnosno sumpornih komponenti nije zabilježen ili je neočekivano negativan (Slika 19). S druge strane, uočen je očekivani negativni utjecaj sumpornih komponenti na razvoj predstavnika vezanih za ciklus N, i obrnuto, utjecaj dušikovih komponenti na razvoj predstavnika karakterističnih za ciklus S.



Slika 19. Kauzalni učinak abiotičkih parametara na zastupljenost izdvojenih porodica.

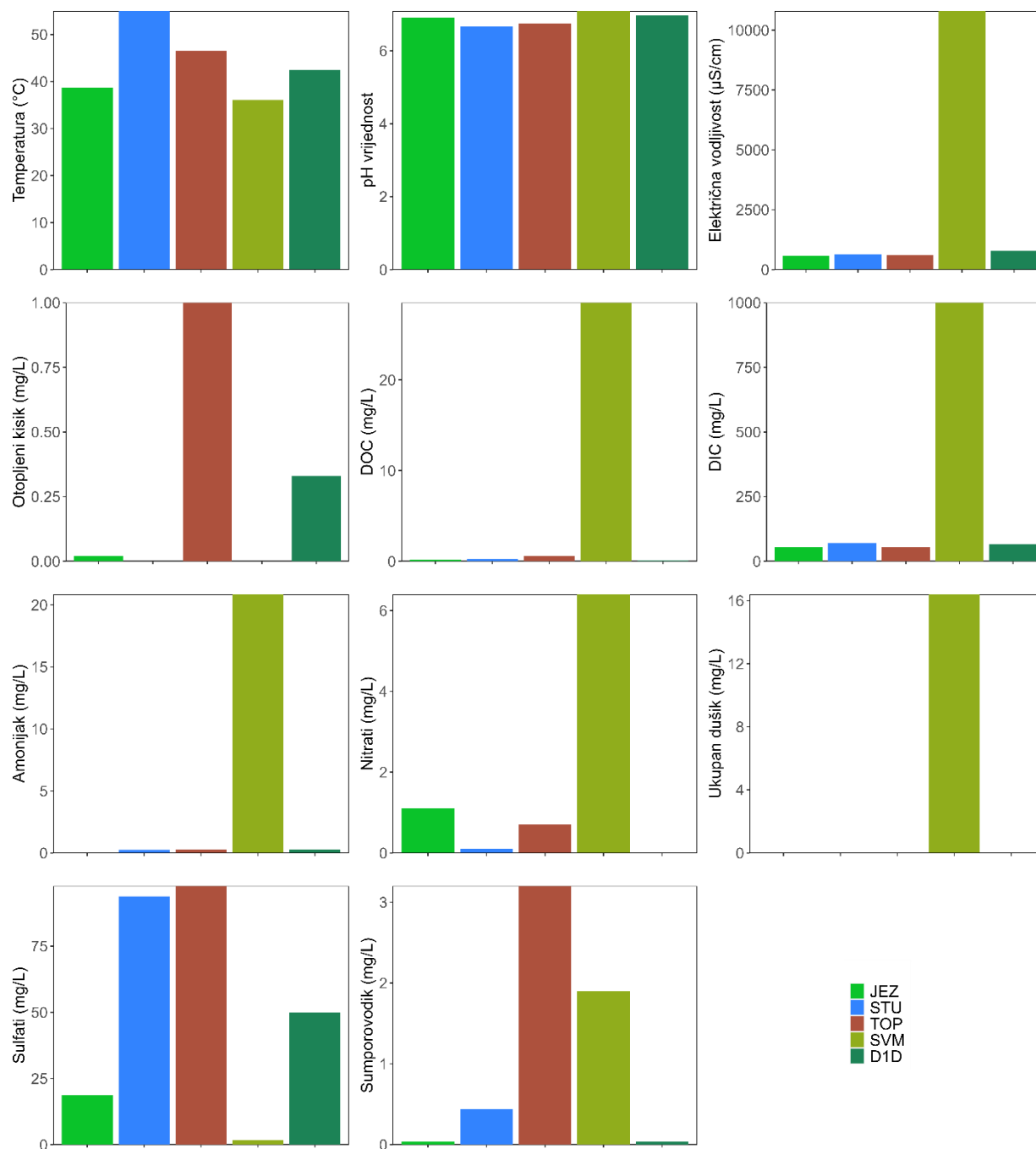
4.2. Druga faza istraživanja

4.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva vode

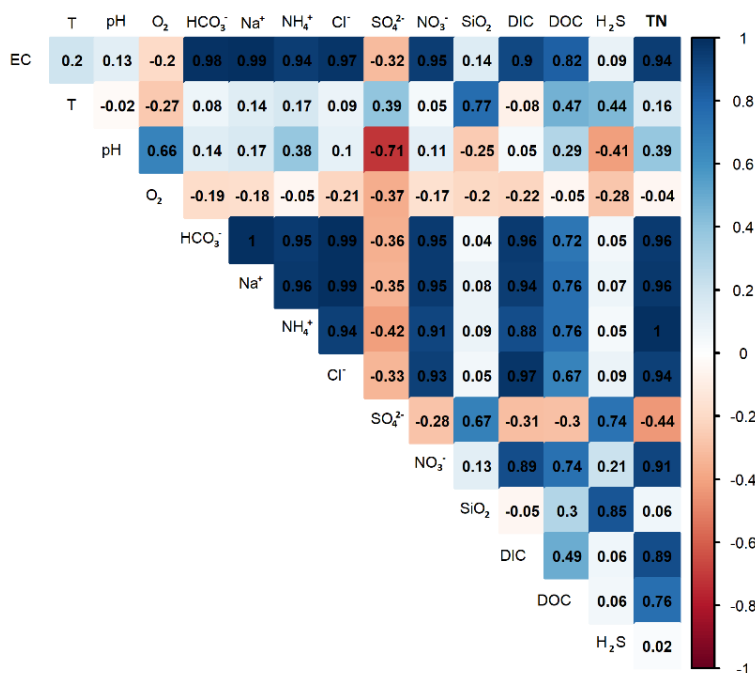
Na 14 geotermalnih lokaliteta na kojima se istraživala zajednica mikrobnih eukariota tijekom jeseni 2020. godine (SVM, TOP, D1D, TUH, VAR, SJA, JEZ, AVD, BIZ, BOS, IVD, KRA, STU, KRE), temperatura vode razlikovala se po mjestu uzorkovanja. Najniža temperatura izmjerena je u SJA (23,7 °C), a najviša u BIZ (64,8 °C) (Tablica 12), dok su pH vrijednosti bile neutralne do blago lužnate, isto tako oviseći o mjestu uzorkovanja (Tablica 12, Slika 20). Od mjesta uzorkovanja ukupno je 5 lokaliteta na kojima je utvrđena najveća prisutnost predstavnika mikrobne zajednice eukariota poput JEZ, STU, TOP, SVM i D1D, a od njih najvišu temperaturu imao je lokalitet STU (55 °C) te najnižu SVM (36,1 °C) (Slika 20).

Lokaliteti poput JEZ, KRA, STU, TUH, VAR i SVM bili su anoksični tijekom jeseni 2020. Najviše koncentracije DIC i DOC izmjerene su u BIZ i SVM, dok su na drugim mjestima uzorkovanja bile jako niske, posebno koncentracije DOC-a. Koncentracije nutrijenata poput dušika i sumpora također su varirale ovisno o mjestu uzorkovanja. Najviše koncentracije NH_4^+ , NO_3^- i TN zabilježene su u SVM (Tablica 12, Slika 20), dok su koncentracije H_2S i SO_4^{2-} izmjerene u jako visokim koncentracijama na lokalitetu VAR, na što je upućivao i sami miris vode prilikom uzorkovanja (Tablica 12).

Uočena je pozitivna korelacija između električne vodljivosti, HCO_3^- , Na^+ , Cl^- i DIC koncentracija, što je bilo i očekivano. Osim toga, isti parametri pozitivno su korelirali i s koncentracijama NH_4^+ , NO_3^- i TN. Na pozitivnu korelaciju ukazuju i koncentracije H_2S i SO_4^{2-} dok koncentracije NO_3^- , NH_4^+ i TN ukazuju na međusobno jaču pozitivnu korelaciju od sumpornih vrijednosti (Slika 21).



Slika 20. Fizikalno-kemijski parametri geotermalne vode (temperatura, pH vrijednost, električna vodljivost, koncentracija kisika, DOC, DIC, amonija i nitrata, ukupan dušik, koncentracija sulfata i sumporovodika) izmjereni tijekom jeseni 2020. na mjestu uzorkovanja onih lokaliteta na kojima je utvrđena najveća prisutnost predstavnika mikrobne zajednice eukariota: JEZ (Jezerčica, Skupina 1), STU (Stubičke toplice, Skupina 1), TOP (Topusko, Skupina 1), SVM (Toplice sv. Martin, Skupina 2) i D1D (Daruvarske toplice – Marijino vrelo, Skupina 3).



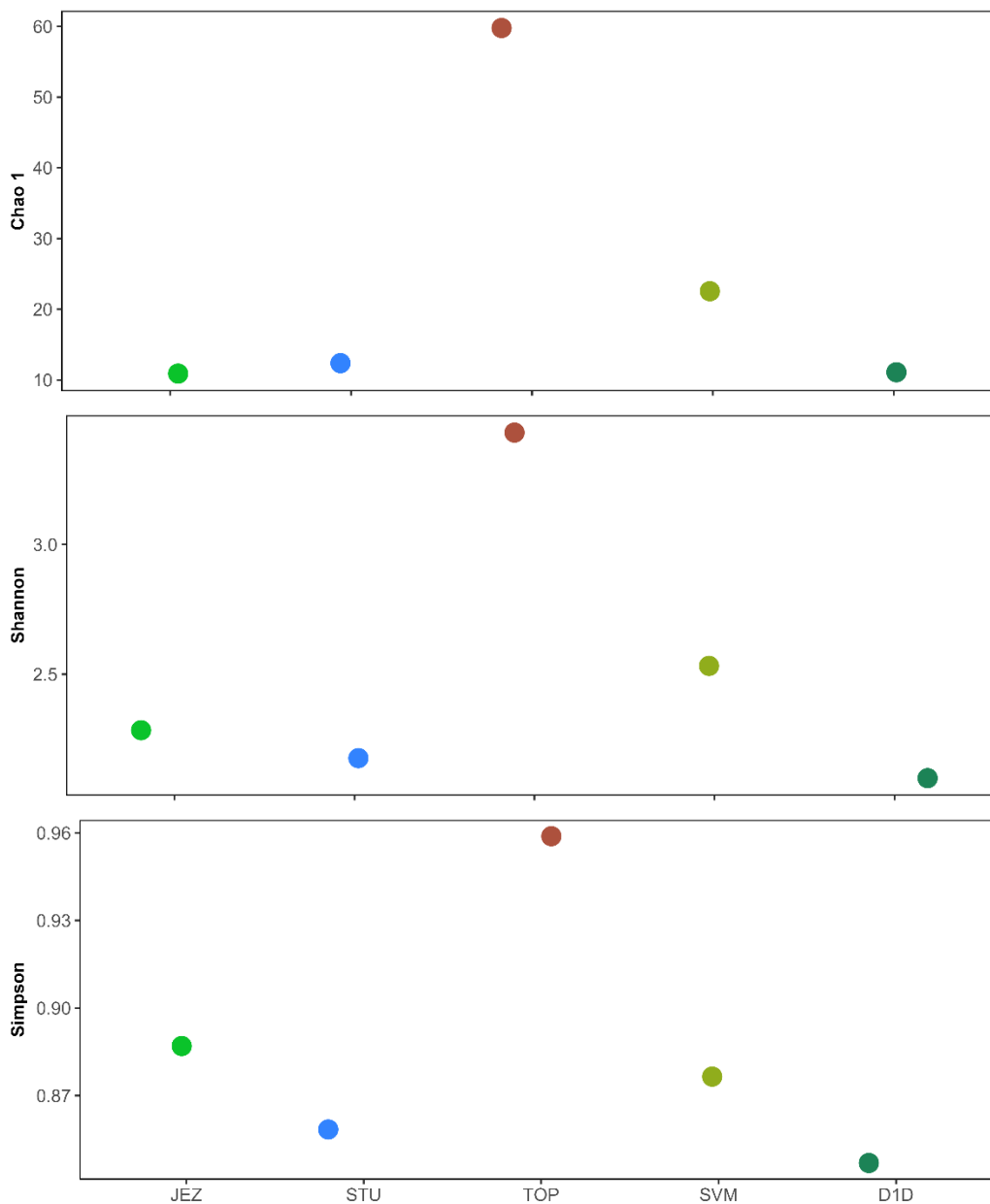
Slika 21. Korelacijska analiza na bazi Pearson koeficijenta na normaliziranom setu podataka fizikalno-kemijskih parametara tijekom kampanje uzorkovanja u jesen 2020. godine.

4.2.2. Sastav i raznolikost zajednice eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske

Istraživanje mikrobnih eukariota odrađeno je tijekom jesenske kampanje uzorkovanja 2020. godine. Istraživanje sastava eukariota kroz samo jednu sezonu podcjenjuje njihovu sezonalnu raznolikost, no za ubuduće pruža mogućnost ispitivanja utjecaja sezone i okolišnih parametara na cjelokupnu strukturu eukariotske zajednice u geotermalnim vodama Hrvatske.

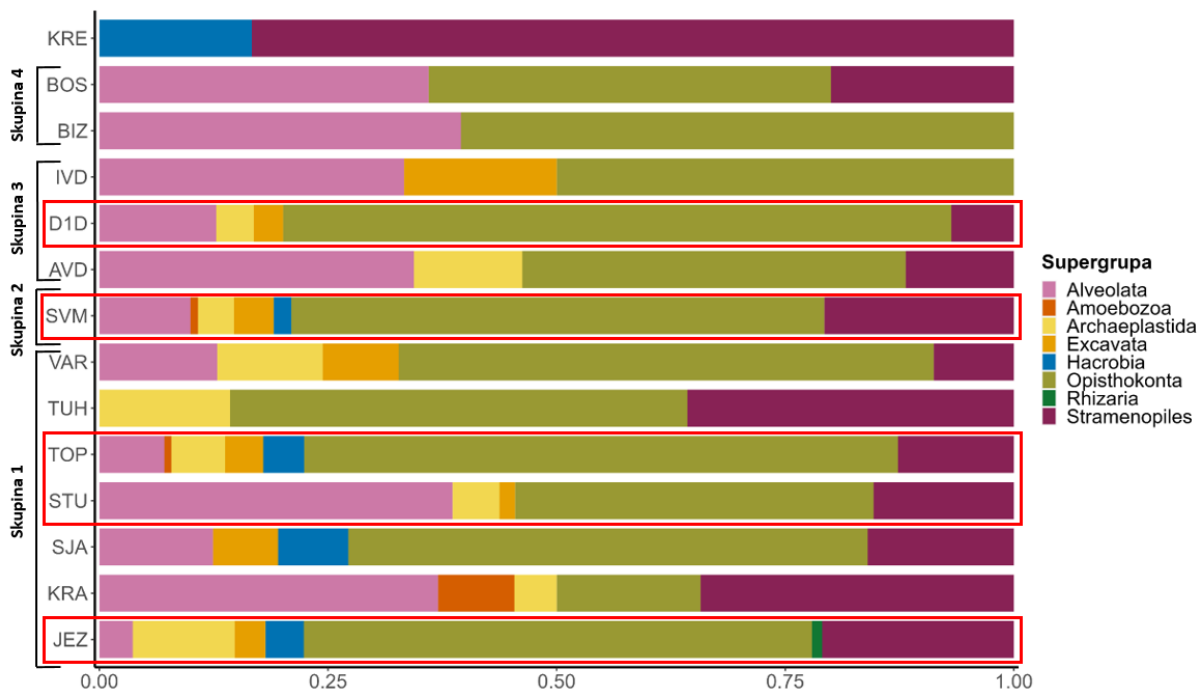
„Phyloseq” objekt sadržavao je taksonomsku tablicu sa 174 svojte u 14 uzoraka, dok je „phyloseq” objekt bez Metazoa sadržavao 134 svojte u 5 izdvojenih uzoraka korišten u većini statističkih analiza. Nakon filtriranja, najveći broj očitavanja zabilježen je u TOP (n = 1646, a uzorak s najmanjim brojem očitavanja bio je STU (n = 122). Prije procjene alfa raznolikosti, podaci su svedeni na brojčano isti skup podataka onog uzorka s najnižim očitanjem na setu podataka bez Metazoa. Alfa raznolikost preko Chao1 indeksa ukazuje na najveće bogatstvo i raznolikost vrsta u TOP (Skupina 1), a najniže u JEZ (Skupina 1), DID (Skupina 3) i STU (Skupina 1) (Slika 22). U

„phyloseq“ objektu sa svim analiziranim uzorcima, Shannon i Simpson indeksi sugerirali su na najnižu alfa raznolikost u KRE i IVD (Skupina 3) koje slijede uzorci iz Skupine 4 (BIZ i BOS) te TUH (Skupina 1) (Prilog 4).



Slika 22. Indeksi alfa raznolikosti (gornji graf: bogatstvo vrsta (Chao1); srednji graf: Shannon indeks raznolikosti; donji graf: Simpson indeks raznolikosti) na 5 lokaliteta s najviše utvrđenih predstavnika mikrobne zajednice eukariota, na temelju prikupljenih uzoraka tijekom jeseni 2020.

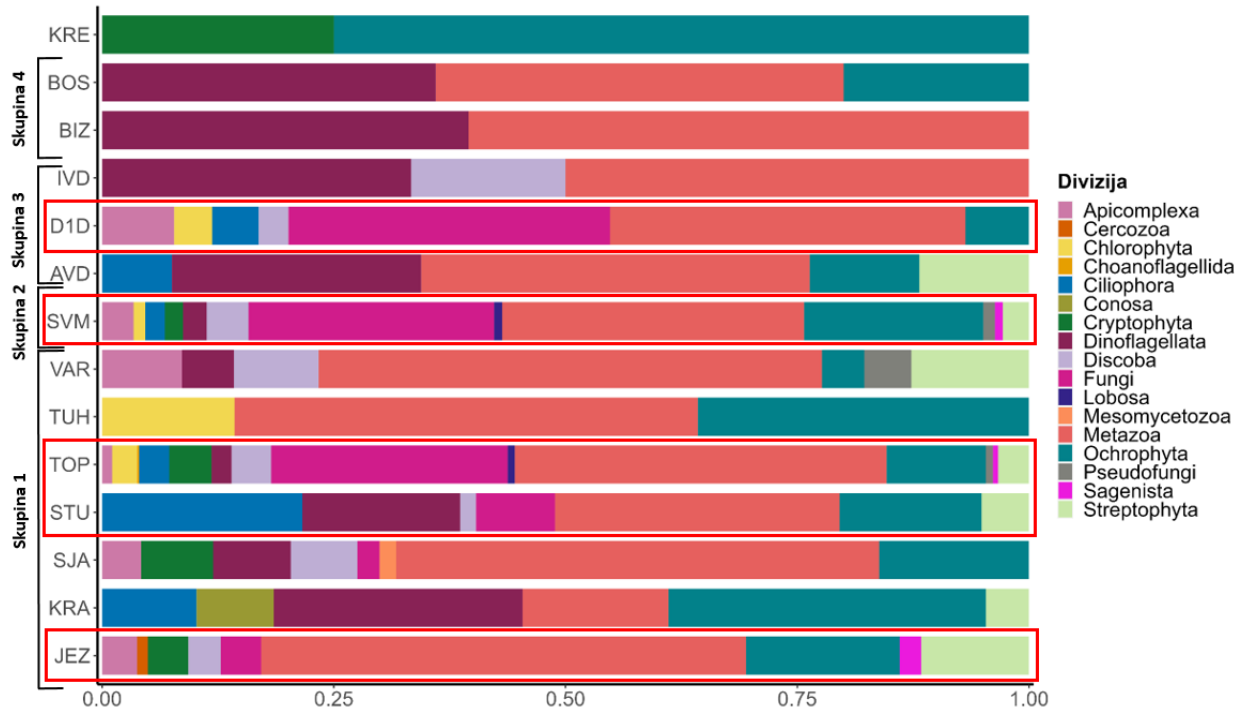
Svoje su grupirane u taksonomske kategorije slijedeći sistematizaciju iz PR² baze podataka (v 4.13., Guillou i sur., 2013). Najzastupljenije taksonomske supergrupe bile su Alveolata (najbrojniji u BIZ (39,5 %)), Opisthokonta (najbrojniji u BIZ (60,5 %)) i Stramenopiles (najbrojniji u KRE (83,3 %)) na gotovo svim mjestima uzorkovanja (Slika 23). Predstavnicu unutar Amoebozoa pronađeni su samo u KRA (8,3 %), SVM (0,82 %) i TOP (0,75 %) dok su predstavnici supergrupe Rhizaria uočeni samo u JEZ s vrlo malom relativnom zastupljenošću od 1,12 %.



Slika 23. Relativna zastupljenost svih eukariotskih zajednica na razini supergrupe identificiranih na 14 geotermalnih lokaliteta u Hrvatskoj tijekom jeseni 2020. godine. Crvenim pravokutnicima izdvojeno je 5 lokaliteta na kojima se utvrdio najveći broj identificiranih mikrobnih eukariota.

Alveolata se pretežno sastojala od predstavnika skupina Apicomplexa, Ciliophora i Dinoflagellata. Relativna zastupljenost Dinoflagellata bila je vrlo visoka na pojedinim lokalitetima poput BIZ (39,5 %), BOS (36 %), IVD (33,3 %), AVD (26,9 %), KRA (26,9 %) i STU (17 %) gdje su činili jednu od dominantnih skupina uz predstavnike Metazoa koji su dio supergrupe Opisthokonta i Ochrophyta (supergrupa Stramenopiles), dvije najzastupljenije skupine i na drugim uzorkovanim lokalitetima (Slika 24). KRE i BIZ su jedini lokaliteti čija se mikrobnja zajednica sastojala samo od dvije skupine mikrobnih eukariota, a IVD, BOS i TUH od ukupno tri

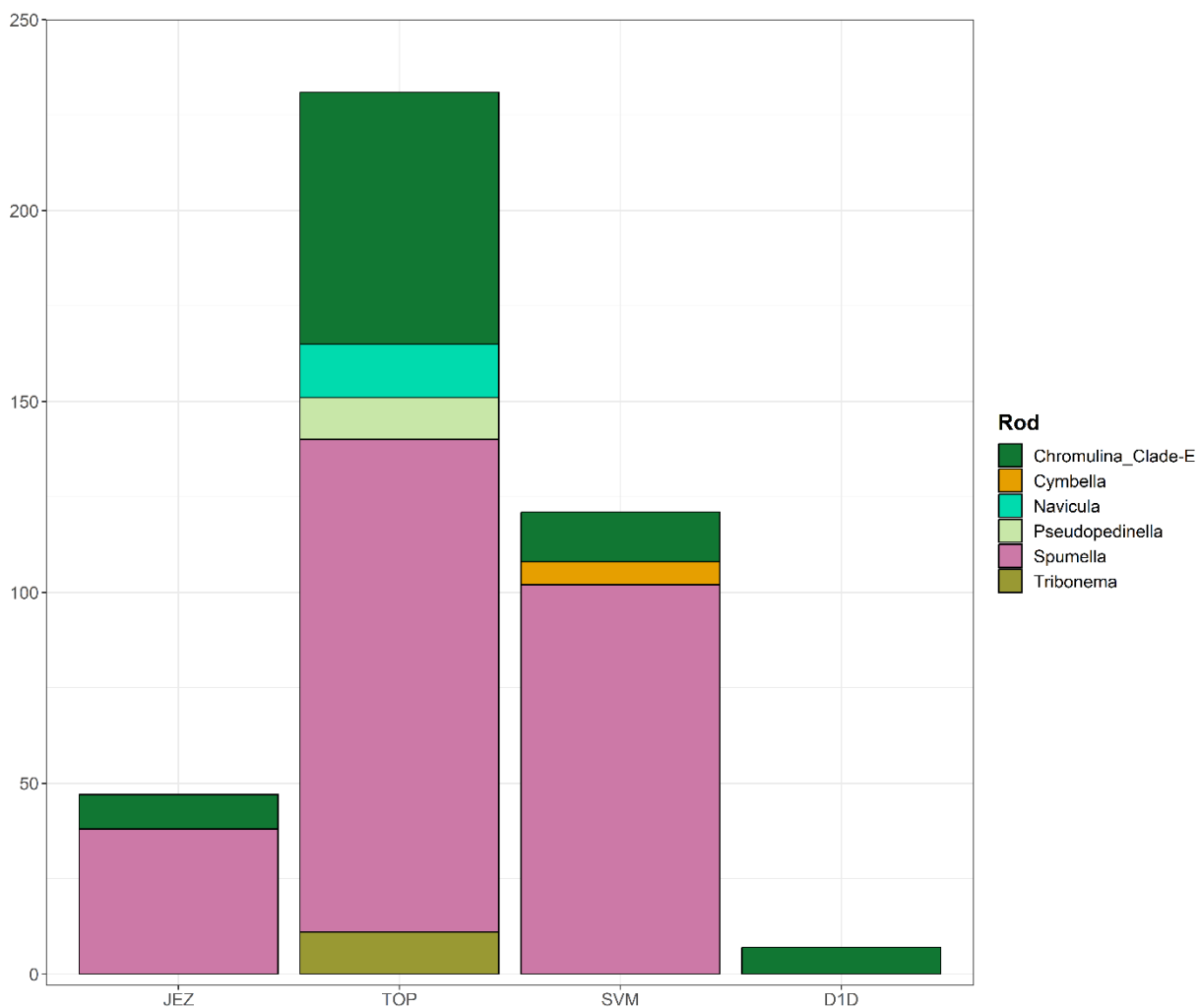
identificirane skupine što dodatno potvrđuje rezultate Shannon i Simpson indeksa raznolikosti (Prilog 4, Slika 24). Uzorci D1D (Skupina 3) i TOP (Skupina 1) pokazali su najveću raznolikost pronađenih skupina unutar podjele prema vrsti vodonosnika (Slika 24).



Slika 24. Relativna zastupljenost svih eukariotskih zajednica na razini divizije identificiranih na 14 geotermalnih lokaliteta u Hrvatskoj tijekom jeseni 2020. godine. Crvenim pravokutnicima izdvojeno je 5 lokaliteta na kojima se utvrdio najveći broj identificiranih mikrobnih eukariota.

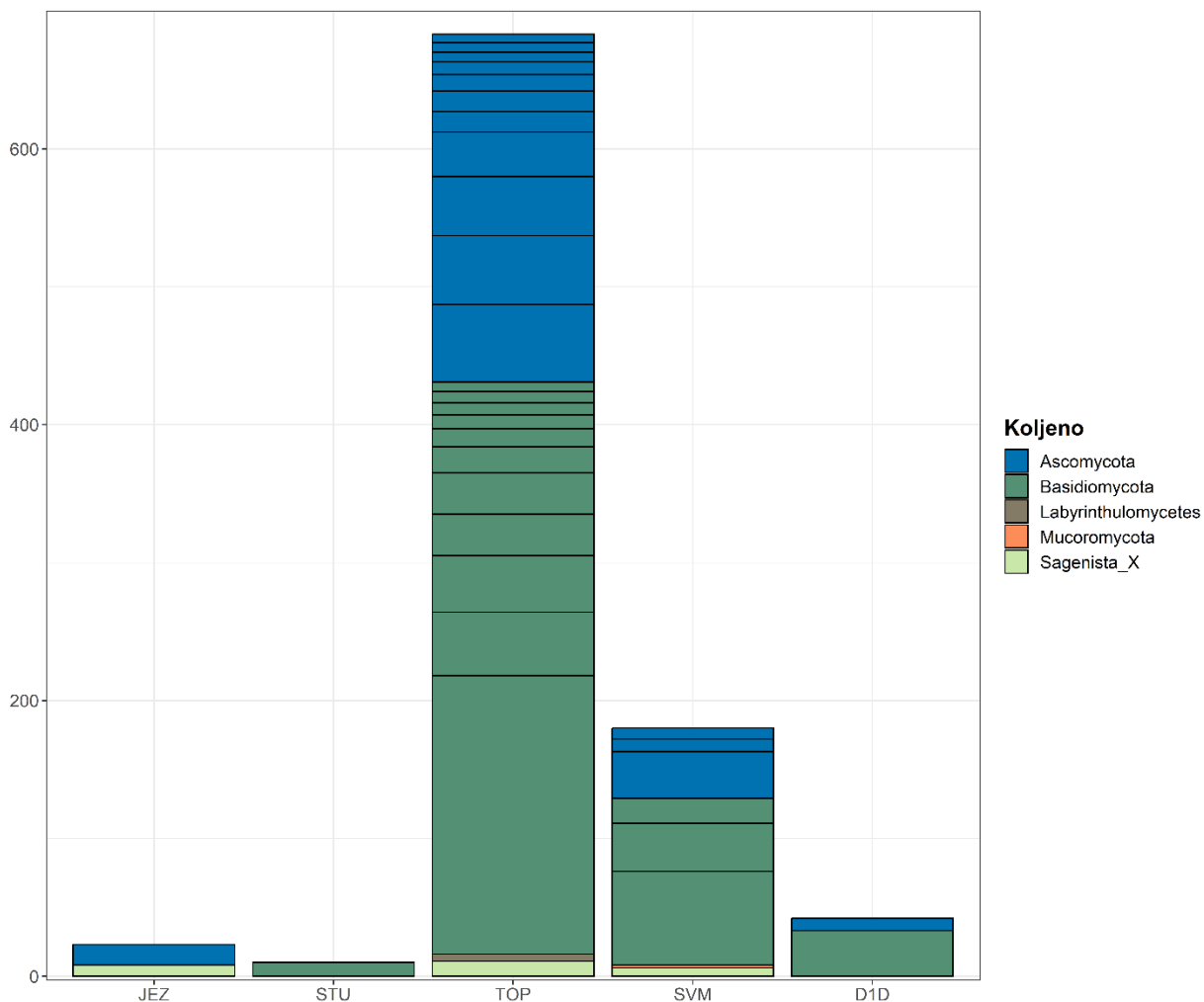
Najveća razlika u kompoziciji mikrobnih eukariota uočena je na lokalitetu KRE koji je imao najveću relativnu zastupljenost koljena Cryptophyta (supergrupa Hacrobia) s porodicom Cryptophyceae te Ochrophyta (supergrupa Stramenopiles) s dijatomejama (Bacillariophyceae) koji na drugim mjestima uzorkovanja nisu uopće zastupljeni ili su pronađeni u manjem postotku (Prilog 4, Slika 24). Nadalje, jedino na lokalitetu KRA uočeno je prisutstvo roda *Filamoeba*, predstavnika Conosa (9,9 %) (Slika 24), dok je jedino na lokalitetu TUH zabilježen rod *Chlorochytrium* (Chlorophyta, 28,6 %) te na lokalitetu KRE rod *Chilomonas* (Cryptophyta, 25 %). Isto tako, predstavnici Cercozoa prisutni su samo na lokalitetu JEZ (2,4 %), Mesomycetozoa na lokalitetu SJA (3,75 %) i Choanoflagellida na lokalitetu TOP (0,36 %) u neznčajnim postotcima.

Osim predstavnika Bacillariophyceae i Chrysophyceae, skupina Ochrophyta sadržavala je i predstavnike unutar porodica Xanthophyceae i Dictyochophyceae. Daljnjim istraživanjem stvarne zastupljenosti navedenih porodica na 5 izdvojenih lokaliteta, rod *Spumella* pokazao se kao glavni predstavnik porodice Chrysophyceae (Prilog 5, Slika 25). Pronađeni značajni rodovi primarnih proizvođača na 5 izdvojenih lokaliteta bili su *Navicula* i *Cymbella* (Bacillariophyceae), *Chromulina* (Chrysophyceae) i *Tribonema* (Xanthophyceae) (Slika 25).



Slika 25. Stvarna zastupljenost rodova izdvojenih na 4 lokaliteta na kojima je utvrđen najveći broj identificiranih mikrobnih eukariota tijekom jeseni 2020. godine. Izdvojeni su svi identificirani rodovi unutar porodica koje inače sadržavaju poznate predstavnike povezane s procesom primarne produkcije.

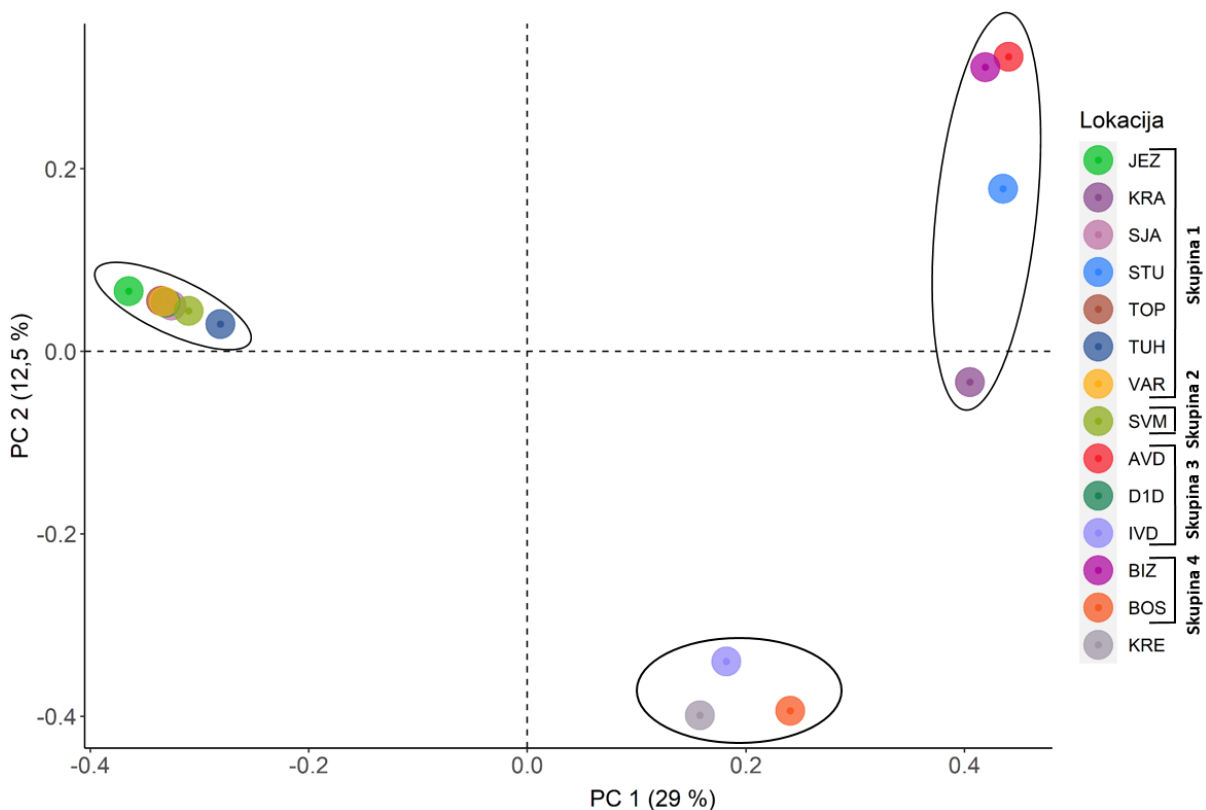
Relativna zastupljenost Fungi (supergrupa Opisthokonta) pokazala se najvećom na lokalitetima D1D (34,7 %), SVM (25,6 %) i TOP (24,9 %) (Slika 24). Najzastupljeniji su bili predstavnici Basidiomycota (SVM (16,5 %), D1D (15,1 %) i TOP (14,8 %)) te Ascomycota (TOP (8,9 %) i SVM (6,9 %)) (Slika 26) sa najabundantnijim rodovima poput *Malassezia*, *Candida* i *Rhodosporidium* (Prilog 6).



Slika 26. Stvarna zastupljenost koljena izdvojenih na 5 lokaliteta na kojima je utvrđen najveći broj identificiranih mikrobnih eukariota tijekom jeseni 2020. godine. Izdvojena su sva identificirana koljena iz skupina Fungi i Sagenista koja inače sadržavaju poznate predstavnike povezane s procesima razgradnje organske tvari.

Ostali najzastupljeniji rodovi mikrobnih eukariota po pojedinim lokalitetima bili su *Spumella* (Chrysophyceae, (TUH, 71,4 %; SJA, 28,8 %; JEZ, 23,2 %; SVM, 21,3 %)), *Naegleria* (Discoba, (IVD 33,3 %; VAR, 14,4 %; SJA, 8,8 %)), *Cryptomonas* (Cryptophyta, (SJA, 16,3 %; JEZ, 9,1 %)) te *Spirogyra* (Streptophyta, (AVD, 12,9 %; STU, 7,4 %)).

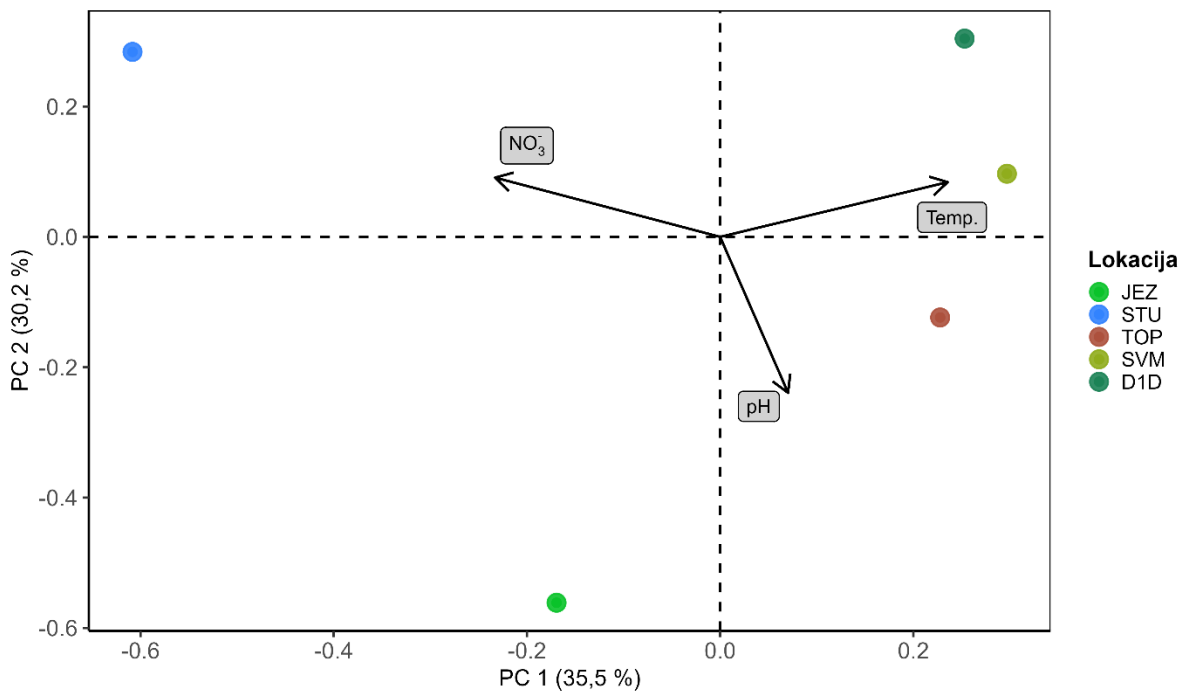
Specifično grupiranje eukariotskih zajednica prikazano je PCoA analizom i provjereno PERMANOVA testom, a pokazuje da se zajednice ne grupiraju po vrsti vodonosnika ($p = 0,508$, $R^2 = 0,30665$) ili tipu geotermalnog lokaliteta (bušotina ili izvor, $p = 0,722$, $R^2 = 0,9301$) (Slika 27). Distribucija mikrobnih eukariota ovisila je o mjestu uzorkovanja (Slika 24, Slika 27).



Slika 27. PCoA grupiranje eukariotskih zajednica na temelju Bray-Curtis matrice različitosti tijekom jeseni 2020. godine. Zajednice su prikazane prema mjestu uzorkovanja i vrsti vodonosnika.

4.2.3. Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na sastav zajednice mikrobnih eukariota

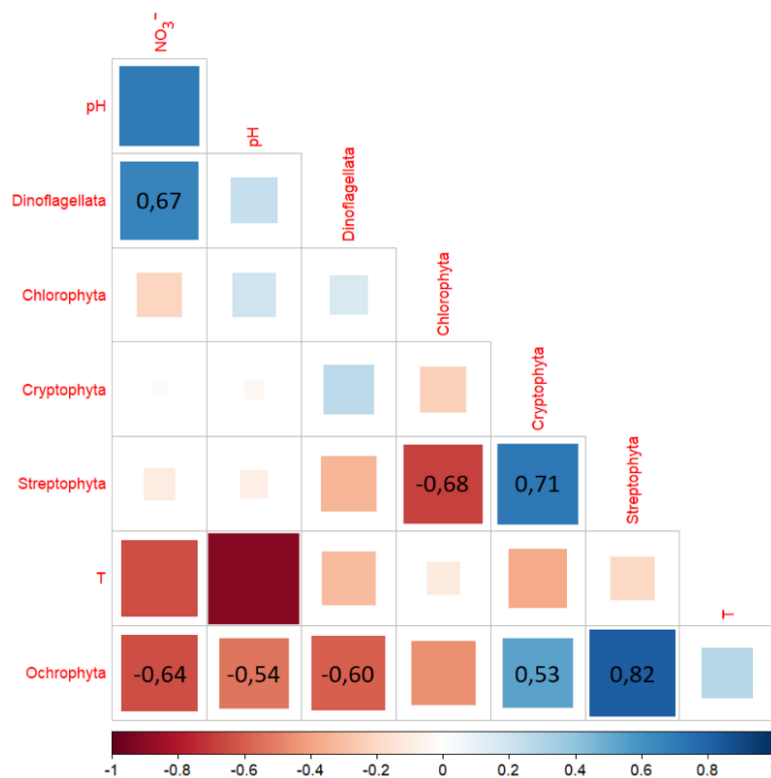
PERMANOVA nije pokazala nikakav utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na oblikovanje mikrobne zajednice eukariota na svim ispitivanim lokalitetima ($p > 0,05$). S druge strane, detaljnijom analizom beta raznolikosti mikrobne zajednice eukariota preko PCoA analize uočena je visoka razlika između sastava zajednice 5 izdvojenih lokaliteta (JEZ, STU, TOP, SVM, D1D) tijekom jeseni 2020. godine. PERMANOVA je pokazala da je najveći utjecaj na oblikovanje strukture mikrobne eukariotske zajednice na 5 izdvojenih lokaliteta imala temperatura ($p = 0,02$, $R^2 = 0,27422$). Ostali okolišni parametri kojima su bile vođene razlike u strukturi zajednice bili su nitrati ($p = 0,05$, $R^2 = 0,20457$) i pH vrijednost ($p = 0,05$, $R^2 = 0,24852$) (Slika 28). Drugi okolišni parametri nisu pokazali statistički značajan utjecaj na strukturu mikrobne zajednice na 5 izdvojenih lokaliteta ($p > 0,05$).



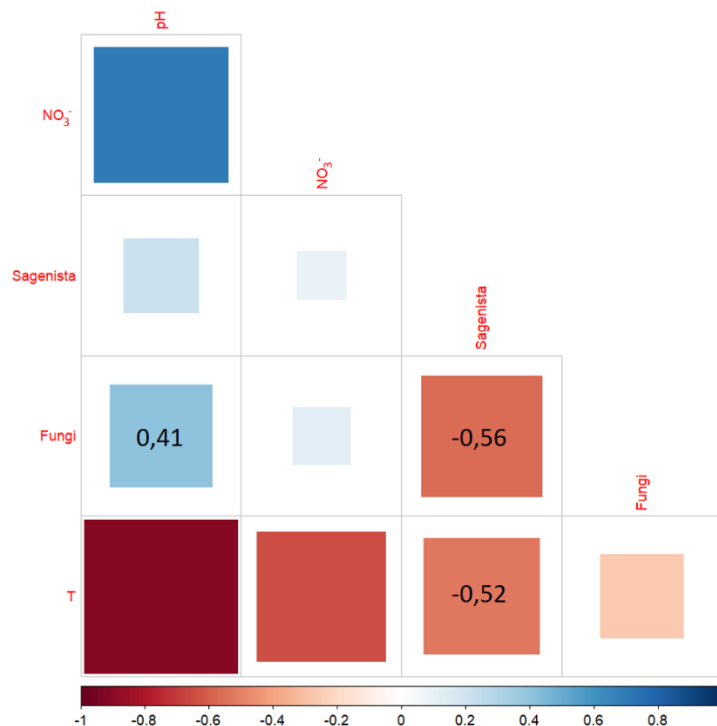
Slika 28. PCoA grupiranje eukariotskih zajednica na 5 lokaliteta s najvećim brojem identificiranih mikrobnih eukariota na temelju Bray-Curtis matrice različitosti tijekom jeseni 2020. godine. Okolišne varijable koje su PERMANOVA testom pokazale značajan ($p < 0,05$) utjecaj na mikrobnu eukariotsku zajednicu prikazane su polupravicima: temperatura, pH i NO_3^- .

Točke su uzorci obojeni po mjestu uzorkovanja.

Rezultati korelacijske analize na bazi Pearson koeficijenta između parametara koji su pokazali statistički značajan utjecaj na zajednicu i skupina s poznatim predstavnicima primarnih proizvođača ukazali su na pozitivnu korelaciju Dinoflagellata i nitrata te na negativnu korelaciju Ochrophyta sa nitratima i pH vrijednosti (Slika 29). Isto tako, rezultati korelacije ukazali su na najsnažniju pozitivnu korelaciju između predstavnika Ochrophyta i Streptophyta te Streptophyta i Cryptophyta (Slika 29). S druge strane, uočena je negativna korelacija predstavnika Streptophyta i Chlorophyta. Uočena je i negativna korelacija predstavnika Fungi i Sagenista, kao i Sagenista s parametrom temperature te pozitivna korelacija Fungi s pH vrijednosti (Slika 30). Gledajući parametre, utvrđena je potpuna negativna korelacija temperature i pH, jaka negativna korelacija temperature s nitratima te pozitivna korelacija pH vrijednosti i nitrata (Slika 29, Slika 30).



Slika 29. Korelacijska analiza na bazi Pearson koeficijenta na normaliziranom setu podataka fizikalno-kemijskih parametara ($p < 0,05$) i na razini divizije, koja inače sadržavaju većinu predstavnika povezanih s procesom primarne produkcije, s 5 izdvojenih lokaliteta.



Slika 30. Korelacijska analiza na bazi Pearson koeficijenta na normaliziranom setu podataka fizikalno-kemijskih parametara ($p < 0,05$) i na razini divizije, koja inače sadržavaju većinu predstavnika povezanih s procesima razgradnje organske tvari, s 5 izdvojenih lokaliteta.

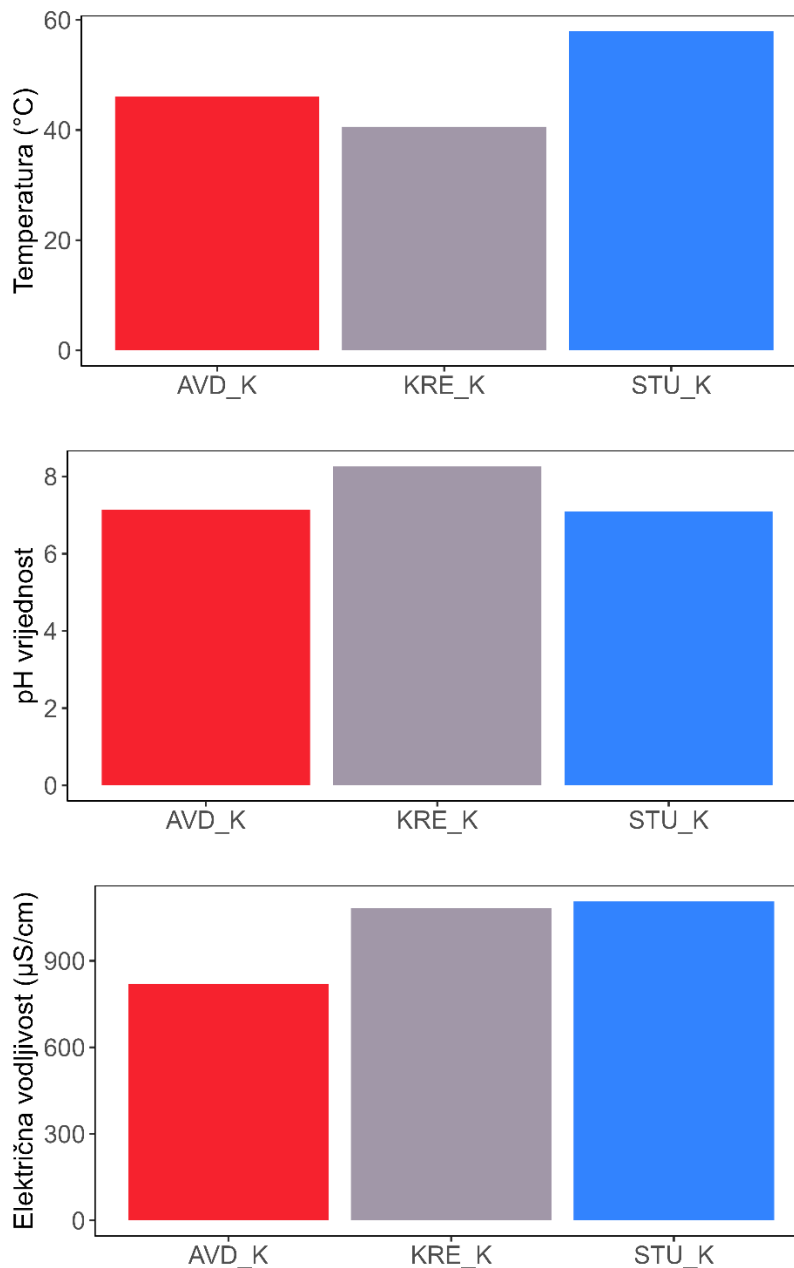
4.3. Treća faza istraživanja

4.3.1. Uzgoj kultura

4.3.1.1. Fizikalno-kemijski parametri vode korištene za inokulaciju i uzgoj prokariotske mikrobne zajednice

Inokulacija prilagođenih hranjivih podloga provedena je s uzorcima geotermalne vode uzorkovane na sljedećim lokalitetima: Antunovo vrelo (AVD), Krečaves (KRE) i Stubičke toplice (STU). Glavni fizikalno-kemijski parametri vode uzrokovane tijekom rujna 2020. za potrebe inokulacije i uzgoja bakterija i arheja od interesa odgovarali su analiziranim svojstvima vode tijekom tri sezone uzorkovanja u prvoj fazi istraživanja (Slika 31, Tablica 12). Najvišu temperaturu imala je geotermalna bušotina STU (57,9 °C), a najnižu KRE (40,6 °C). Obrnuto je bilo s pH vrijednosti gdje je najveću blago lužnatu pH imala bušotina KRE (8,26), a najniža neutralna pH vrijednost uočena je u STU (7,09). Izmjerena temperatura izvora AVD u rujnu 2020. godine iznosila je 46,1 °C, a pH vrijednost bila je neutralna (7,14) (Slika 31). Vrlo slični rezultati fizikalnih

parametara vode izvora AVD zabilježeni su tijekom listopada 2021. godine ($T = 46,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7,3$, $\text{EC} = 808,5\text{ }\mu\text{S/cm}$).



Slika 31. Fizikalni parametri izmjereni tijekom rujna 2020. godine na tri lokacije (AVD_K: Antunovo vrelo; STU_K: Stubičke toplice; KRE_K: Krečaves) geotermalnih voda u Hrvatskoj za potrebe uzgoja kultura.

4.3.1.2. Struktura uzgojene mikrobne zajednice prokariota

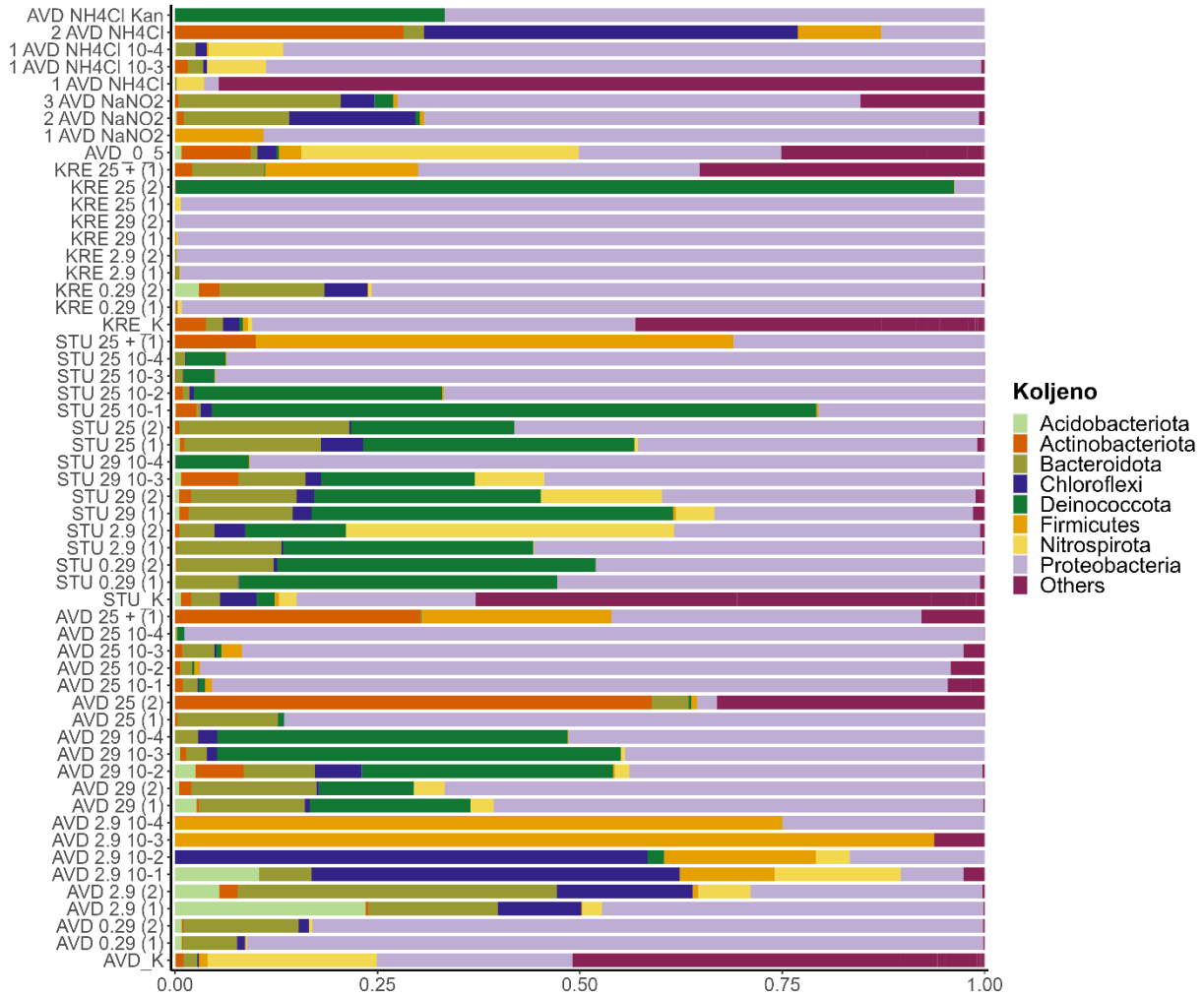
Za utvrđivanje strukture uzgojene prokariotske mikrobne zajednice sa 3 geotermalna lokaliteta u Hrvatskoj (AVD, STU i KRE), 16S rRNA dijelovi gena bakterija i arheja su sekvencirani iz 56 uzoraka kultura tijekom dvije godine uzgoja.

Sekvenciranje kultura rezultiralo je ukupnim brojem od 4476 svojti. Nakon filtriranja, konačni „phyloseq” objekt sadržavao je taksonomsku tablicu sa 429 svojti u 56 uzoraka te je isti korišten za daljnje statističke analize. Nakon filtriranja, najveći broj očitavanja zabilježen je u kulturi uzorka AVD 0,29 (1) ($n = 43\ 604$). Najmanji broj očitavanja (< 100) imali su svi uzorci kultura s antibiotikom te neka razrijeđenja koja nisu uzimana u obzir prilikom procjene alfa raznolikosti. Prije procjene alfa raznolikosti, podaci su svedeni na broječno isti skup podataka onog uzorka s najnižim očitanjem (2 AVD NaNO_2 , $n = 1043$) na nefiltriranom setu podataka.

Sastav uzgojene prokariotske mikrobne zajednice pokazao se ovisan o početnom mjestu uzorkovanja, kroz vrijeme uzgoja specifičan za odabrani medij i vrstu dodanog supstrata, međusobno velike sličnosti posebice kod razrijeđenja (Slika 32) te s manjim utvrđenim bogatstvom vrsta od rezultata sekvenciranja vode koja je služila kao inokulum (Prilog 7). Shannonov i Simpsonov indeks raznolikosti ukazali su na varijabilnost alfa raznolikosti na uzorkovanim lokalitetima (Prilog 7).

U 56 različitih uzoraka kultura utvrđena je prisutnost ukupno 38 različitih prokariotskih koljena (Prilog 8) od kojih njih 7 pripada predstavnicima arheja, a najzastupljenije je koljeno Crenarchaeota. Od predstavnika bakterija, koljeno Proteobacteria prisutno je u većini uzgojenih kultura kao dominantno, a nakon njega slijede predstavnici koljena Deinococota i Firmicutes (Slika 32, Prilog 8). Nešto manje zastupljeni, no u pojedinim uzorcima kultura ipak među dominantnima, jesu predstavnici koljena Chloroflexi, Bacteroidota, Nitrospirota, Actinobacteriota i Acidobacteriota (Slika 32).

Najjedinstveniji i najrazličitiji sastav zajednice bio je karakterističan za uzorke Antunovog vrela s različitom dominacijom predstavnika koljena Actinobacteriota, Proteobacteria, Chloroflexi i Deinococota (AVD 25 (2), 1 AVD NH_4Cl , 2 AVD NH_4Cl , AVD NH_4Cl Kan) te uzorak lokaliteta Krečaves s dodatkom antibiotika (KRE 25 + (1)) zbog najvećeg zabilježenog uzgoja predstavnika koljena Cyanobacteria, Planctomycetota i Desulfobacterota (Slika 32, Prilog 8).



Slika 32. Relativna zastupljenost mikrobne zajednice prokariota na razini koljena identificiranih u uzorcima kultura tijekom 2 godine uzgoja. Za potrebe uzgoja kultura i statističke obrade podataka

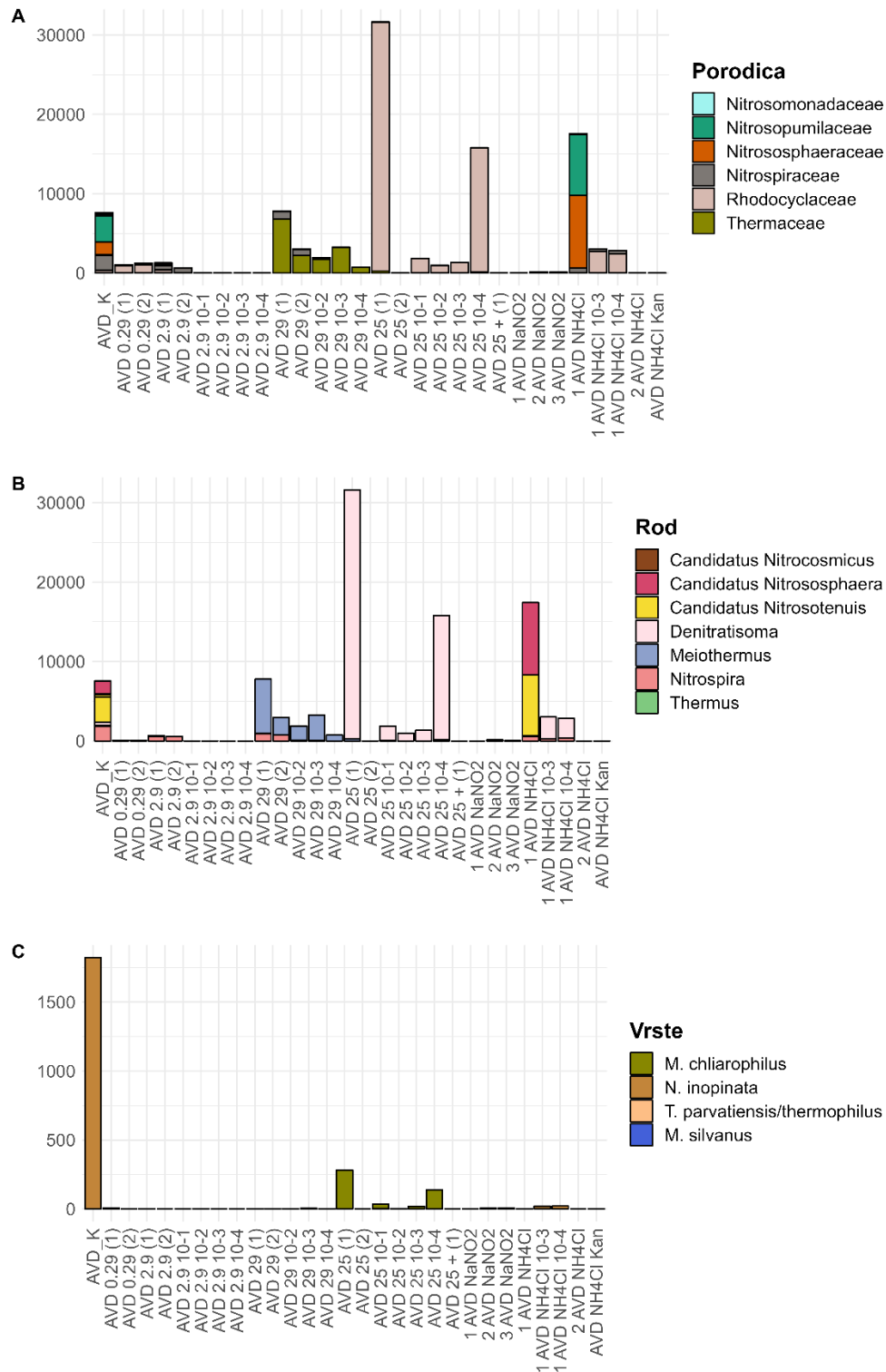
uzorci su podijeljeni po uzorkovanom lokalitetu (AVD – Antunovo vrelo; STU – Stubičke toplice, KRE – Krečaves), vrsti dodanog supstrata (0.29 – 0,29 mM NaNO₂; 2.9 – 2,9 mM NaNO₂; 29 – 29 mM NaNO₂, 25 – 25 mM NH₄Cl, NaNO₂ - 10 mM NaNO₂, NH₄Cl - 10 mM NH₄Cl), dodatku antibiotika (+/Kan), razrijeđenju (10⁻¹ – 10⁻⁴) i krugu sekvenciranja ((1),(2)).

Oznake AVD_K, STU_K, KRE_K i AVD_0_5 predstavljaju vodu koja je korištena kao inokulum. Distribucija vrsta je procijenjena prosječnom relativnom brojnošću većom od 1 % prilikom čega su ostali mikroorganizmi s relativnom brojnošću manjom od 1 % klasificirani kao „Ostatak/Others“.

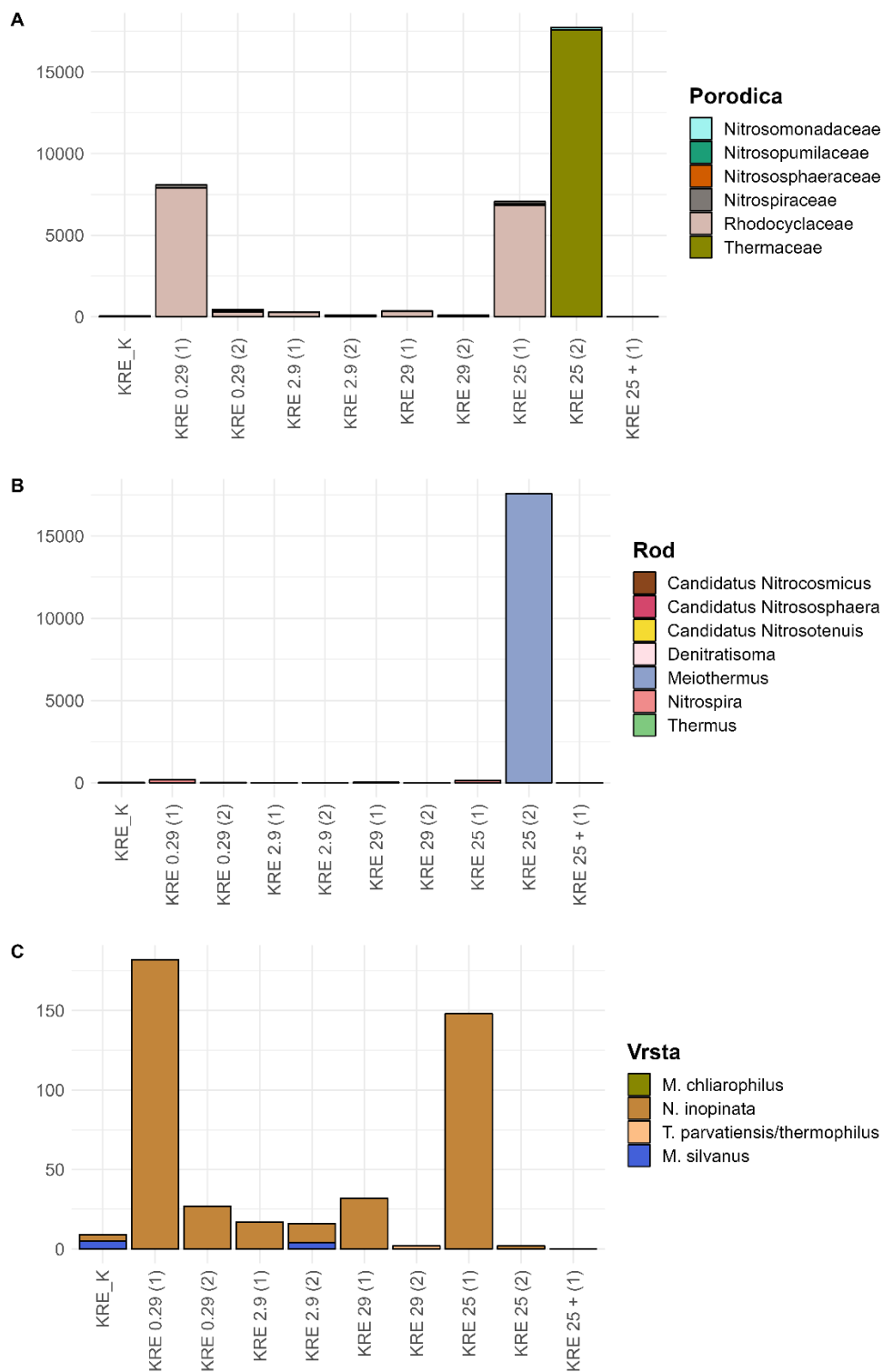
U odnosu na cjelokupnu zajednicu, od svojiti karakterističnih za ciklus dušika, najviša relativna zastupljenost roda *Nitrospira* pronađena je u STU 2,9 (2) (40,5 %), AVD 2,9 10-1 (15,6 %), STU 29 (2) (14,9 %), a vrsta *Candidatus Nitrososphaera* (51,4 %) i *Candidatus Nitrosotenuis* (43,1 %) u 1 AVD NH₄Cl. *Candidatus Nitrososphaera* pronađen je još samo u kulturi AVD 25 (2) u neznačajnom postotku (0,7 %), dok je *Candidatus Nitrosotenuis* utvrđen samo u 3 AVD NaNO₂ (14,4 %) i AVD 0,29 (1) (0,013 %). Rod *Nitrospira* (porodica Nitrospiraceae, koljeno Nitrospirota) u vodi koja je služila kao inokulum bio je zastupljen najviše u AVD_0_5 (32,2 %) i AVD_K (14,8 %), a u puno manjem postotku u STU_K (0,7 %) i KRE_K (0,3 %). Od utvrđenih postotaka vezanih za rod *Nitrospira*, comammox mikroorganizmu *Candidatus Nitrospira inopinata* pripali su vrlo mali postotci (KRE 25 (1,2) (0,68 %; 0,02 %), KRE 0,29 (1,2) (0,56 %; 0,38 %), 1 AVD NH₄Cl 10⁻³ (0,52 %) i 1 AVD NH₄Cl 10⁻⁴ (0,48 %)), s obzirom na utvrđene početne vrijednosti comammox mikroorganizma u vodi koja je služila kao inokulum (AVD_0_5: 31,3 %, AVD_K: 13,6 %, KRE_K: 0,26 %, STU_K: 0,02 %). Odnosi rezultata stvarne zastupljenosti mikroorganizama od interesa na razini porodice (A), roda (B) i vrste (C) između vode korištene kao inokulum i uzgojenih kultura po lokalitetima prikazani su na Slikama 33, 34 i 35.

Vrste roda *Denitratisoma* (Rhodocyclaceae) pronađene su u nekoliko uzoraka kultura većinom vezanih za lokalitet AVD u velikom broju te u dva uzorka lokaliteta STU (Slika 33 B). Porodica Thermaceae ima zastupljene predstavnike u kulturama sva tri lokaliteta poput *Meiothermus chliarophilus*, *Meiothermus silvanus* i *Thermus parvatiensis/thermopilus* (Slika 33, 34, 35) od kojih se posebno istice *M. silvanus* u kulturama lokaliteta STU (Slika 35 B i C).

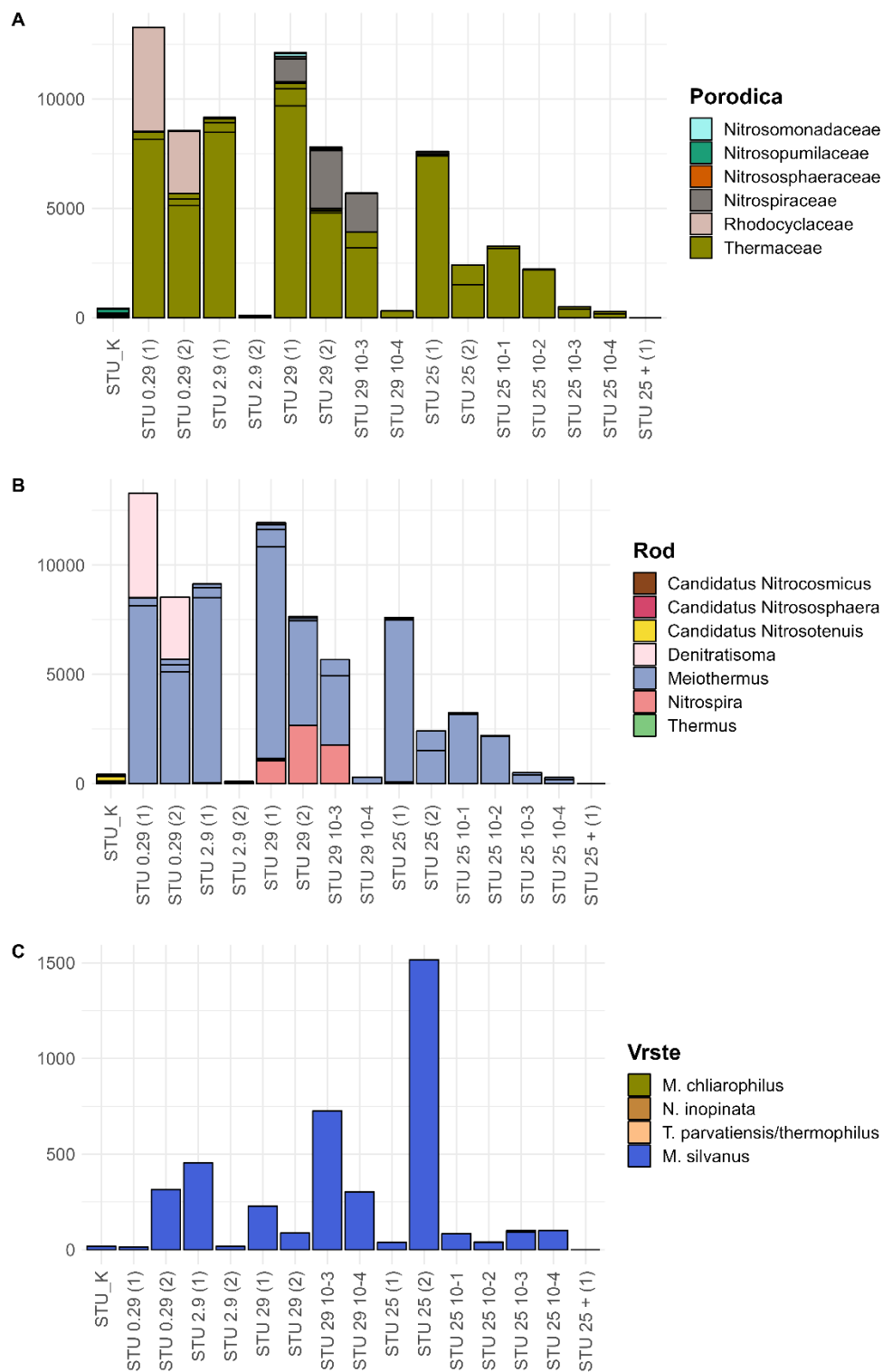
Ostale identificirane vrste u vrlo visokom postotku u većini uzgojenih kultura bile su *Listeria innocua*, (Listeriaceae, Firmicutes), *Bacillus* sp. (Bacillaceae, Firmicutes), *Silanimonas lenta* (Xanthomonadaceae, Gammaproteobacteria), *Caldimonas hydrothermale* (Comamonadaceae, Gammaproteobacteria), *Methyloversatilis discipulorum/universalis* (Rhodocyclaceae, Gammaproteobacteria), *Thermoleophilum* sp. (Thermoleophilaceae, Actinobacteria) i *Porphyrobacter cryptus* (Sphingomonadaceae, Alphaproteobacteria).



Slika 33. Sastav prokariotske mikrobne zajednice uzoraka kultura lokaliteta AVD gdje su ASV-
 evi prikazani na razini porodice, roda i vrste prikazujući stvarnu zastupljenost samo onih
 uzgojenih svojti karakterističnih za ciklus dušika.



Slika 34. Sastav prokariotske mikrobne zajednice uzoraka kultura lokaliteta KRE gdje su ASV-
 evi prikazani na razini porodice, roda i vrste prikazujući stvarnu zastupljenost samo onih
 uzgojenih svojiti karakterističnih za ciklus dušika.



Slika 35. Sastav prokariotske mikrobne zajednice uzoraka kultura lokaliteta STU gdje su ASV-
 evi prikazani na razini porodice, roda i vrste prikazujući stvarnu zastupljenost samo onih
 uzgojenih svojti karakterističnih za ciklus dušika.

Proučavanjem cjelokupne mikrobne zajednice u uzgojenim kulturama, PERMANOVA statističkim testom pokazano je da su svi testirani faktori (supstrat, medij i lokalitet) statistički značajno povezani s oblikovanjem mikrobne zajednice, posebno određeni supstrati i lokaliteti, dok mediji imaju najmanju povezanost (10,265 %) (Tablica 15). Specifično, analiza je otkrila da supstrati različitih koncentracija (NaNO_2 i NH_4Cl) značajno doprinose oblikovanju mikrobne zajednice prokariota u kulturama ($\text{NaNO}_2 - R^2 = 0,15655, p = 0,006$; $\text{NH}_4\text{Cl} - R^2 = 0,22307, p = 0,005$).

Tablica 15. Vrijednosti PERMANOVA testa korištenog na uzgojenoj mikrobnoj zajednici prokariota u odnosu na supstrat, medij i lokalitet. Zvezdicom (*) su označeni parametri koji su pokazali statistički značajan utjecaj na oblikovanje mikrobne zajednice u različitim kulturama ($p < 0,05$).

| Varijabla 1 | Varijabla 2 | PERMANOVA stat R^2 | p |
|--|-------------|----------------------|--------|
| Mikrobna zajednica svih uzoraka | Supstrati | 0,21764 | 0,001* |
| | Mediji | 0,10265 | 0,001* |
| | Lokaliteti | 0,15292 | 0,001* |
| Mikrobna zajednica svih uzoraka AVD | Medij | 0,20873 | 0,001* |
| | Supstrat | 0,43187 | 0,001* |
| Mikrobna zajednica svih uzoraka KRE | Medij | 0,13843 | 0,406 |
| | Supstrat | 0,65275 | 0,024* |
| Mikrobna zajednica svih uzoraka STU | Medij | 0,14564 | 0,057 |
| | Supstrat | 0,52632 | 0,002* |

Proučavanjem uzgojene mikrobne zajednice po pojedinom lokalitetu, rezultati PERMANOVA analize pokazali su da vrsta medija i vrsta supstrata imaju statistički značajan utjecaj na oblikovanje mikrobne zajednice na lokalitetu AVD (Tablica 15). Međutim, u uzorcima

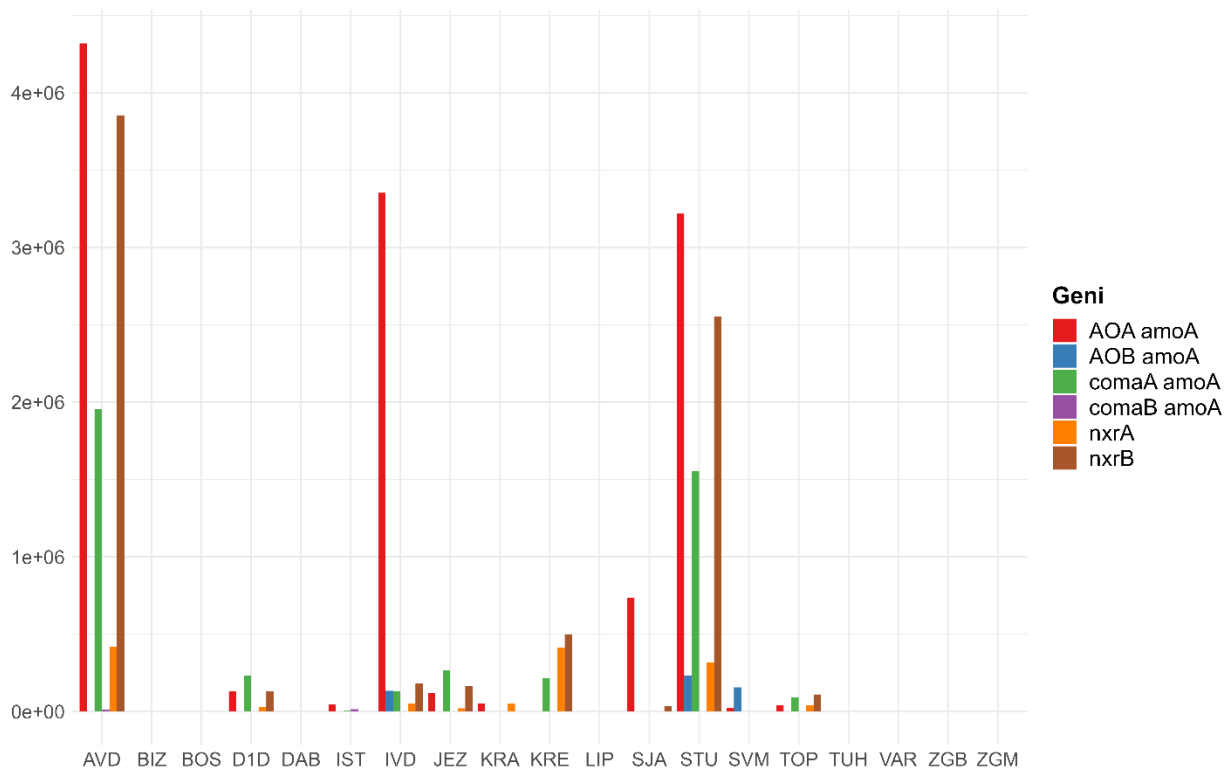
kultura KRE i STU, samo različiti supstrati ukazuju na statistički značajan utjecaj na mikrobnu zajednicu prokariota (Tablica 15).

4.3.1.3. Rasprostranjenost funkcionalnih gena uključenih u ciklus dušika u uzorcima geotermalne vode

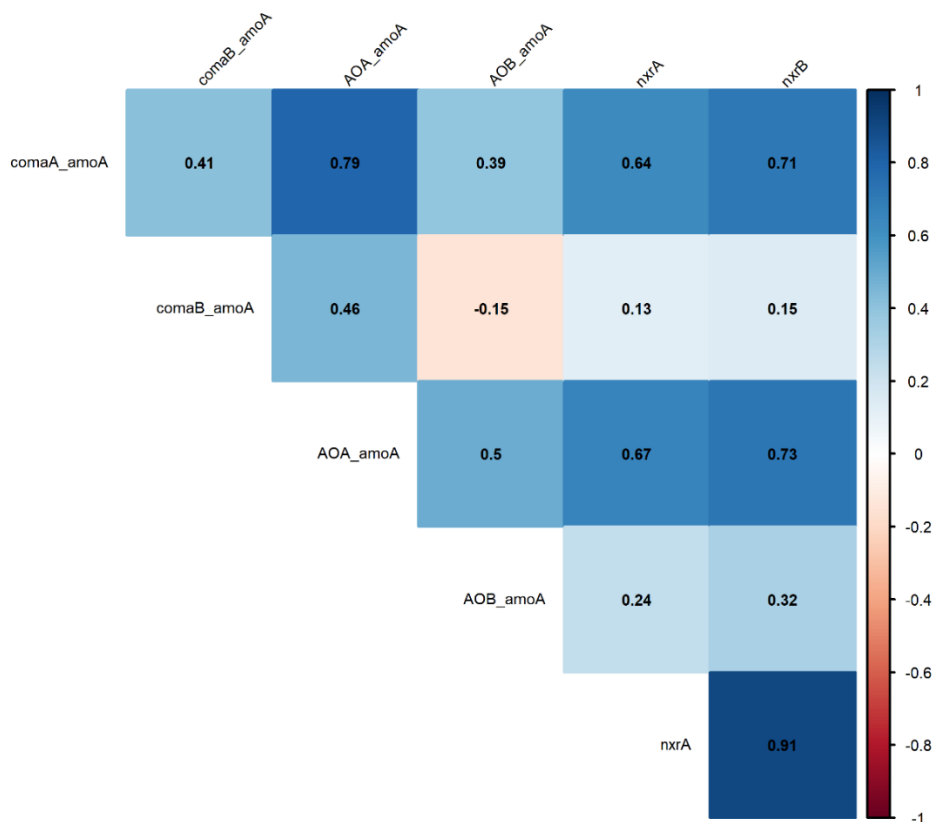
Najveća utvrđena koncentracija *amoA* gena vezana je za predstavnike AOA, čije su kopije gena zabilježene u značajnom broju na lokalitetima AVD, STU, IVD i SJA. Drugi najzastupljeniji gen je comammox A *amoA* gen, detektiran u značajnom broju na lokalitetima AVD i STU (Slika 37). Comammox B *amoA* gen pronađen je samo na lokalitetu IST i AVD, dok je AOB *amoA* gen zabilježen na lokalitetima IVD, STU i SVM (Slika 36). Rezultati qPCR analize pokazuju da su funkcionalni geni *nxB* i *nxA* najviše zastupljeni u geotermalnoj vodi na lokalitetima AVD, STU i KRE (Slika 36). Lokaliteti na kojima je zabilježena prisutnost *nxB* gena, sadržavali su i *nxA* gene, s izuzetkom lokaliteta KRA (Slika 36). Ovaj sličan prostorni raspored broja kopija *nxA* gena uočen je ipak u značajno manjoj koncentraciji u odnosu na *nxB* gene.

Na nekoliko lokaliteta nije zabilježena prisutnost gena povezanih s ciklusom dušika, što je u skladu s rezultatima sekvenciranja uzoraka geotermalne vode (Slika 36). Ti rezultati su korišteni kao osnova za odabir lokaliteta za proceduru kultivacije nitrificirajućih mikroorganizama (Slika 10, Prilog 2, Slika 36).

Rezultati korelacijske analize na bazi Spearman koeficijenta pokazali su snažnu pozitivnu korelaciju između *nxB* i *nxA* gena. Ostali geni su pokazali nešto slabiju pozitivnu korelaciju, s izuzetkom gena AOB *amoA* i comammox B *amoA* koji su pokazali jedinu slabu negativnu korelaciju (Slika 37).



Slika 36. Broj kopija AOA *amoA*, AOB *amoA*, comammox A *amoA*, comammox B *amoA*, *nxrA* i *nxrB* gena uključenih u reakcije nitrifikacije u uzorcima geotermalnih voda dobiveni qPCR analizom. Prikazana je srednja vrijednost broja kopija gena u triplikatu.



Slika 37. Korelacijska analiza (na bazi Spearman koeficijenta) kopija gena uključenih u reakcije nitrifikacije iz uzoraka geotermalnih voda u Hrvatskoj dobivenih qPCR analizom.

4.3.1.4. Utjecaj uvjeta uzgoja na razvoj nitrifikanata

4.3.1.4.1. Najpovoljniji uvjeti uzgoja za pojavu gena važnih u ciklusu dušika

Rezultati qPCR analize funkcionalnih gena uključenih u proces nitrifikacije u uzorcima kultura geotermalnih voda u Hrvatskoj pokazali su da je najveći razvoj AOA *amoA* gena zabilježen u prisutnosti koncentracije supstrata 10 mM NH₄Cl i izvorne vode lokaliteta koja je služila kao medij. Nešto manja zastupljenost AOA vezana je za OHIO medij. S druge strane, AOM medij s niskom koncentracijom CaCO₃ i koncentracija od 25 mM NH₄Cl nisu se pokazali povoljnim za rast AOA (Slika 38 A). AOB *amoA* gen pokazao je veću zastupljenost u uvjetima AOM medija i početne koncentracije od 25 mM NH₄Cl, iako su puno manje zastupljeni od AOA (Slika 38 B).

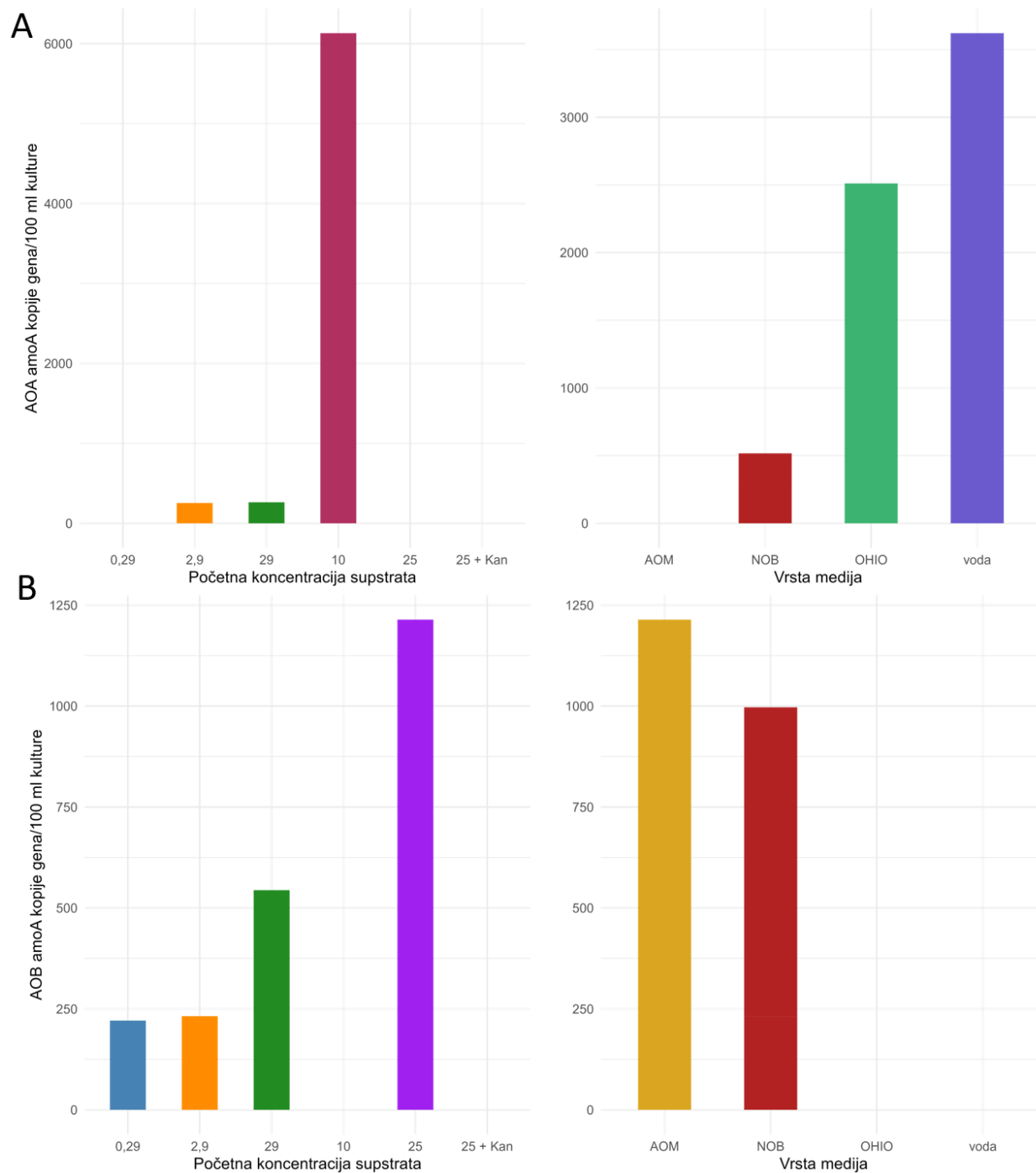
Očekivano, optimalni uvjeti za razvoj *nxrA* i *nxrB* gena bili su prisutnost NOB medija s početnom koncentracijom od 29 mM NaNO₂. Međutim, *nxrB* gen je uočen u puno većoj

koncentraciji, za razliku od *nxrA* gena, što je u skladu s qPCR rezultatima dobivenim u uzorcima geotermalne vode (Slika 39 A,B, Slika 36).

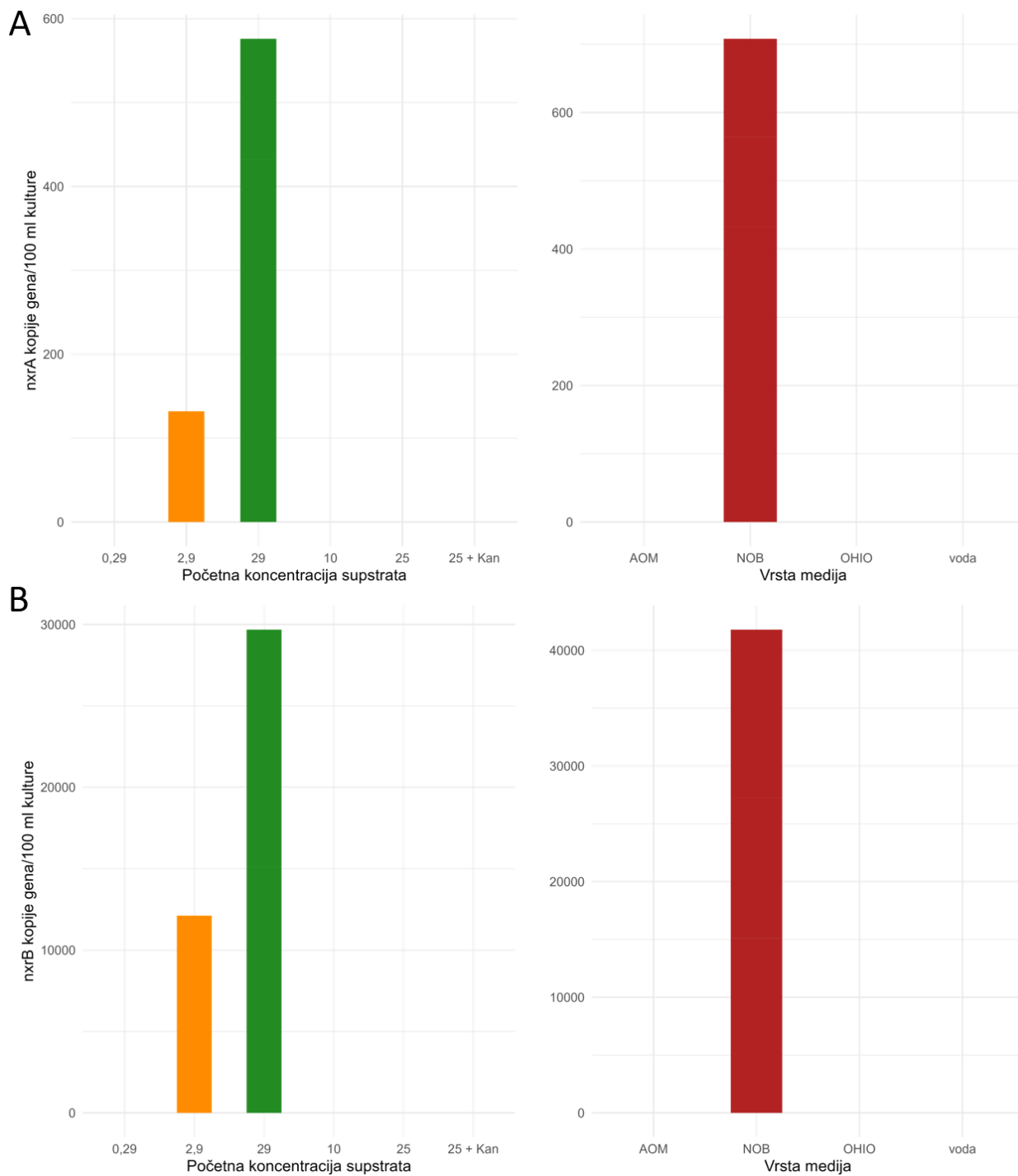
Comammox organizmi su se uspješno razvili na sva 4 medija, ali najoptimalniji uvjeti za njihov rast bili su povezani s OHIO medijem i početnom koncentracijom supstrata od 10 mM NH₄Cl (Slika 40 A, B).

Rezultati qPCR analize su usklađeni s rezultatima sastava mikrobne zajednice dobivene sekvenciranjem 16S rRNA gena (Slika 32, Slika 33, Slika 34, Slika 35), iako je zabilježena manja koncentracija gena u kulturama u usporedbi s izvornom geotermalnom vodom, što je očekivano zbog manjeg volumena kulture.

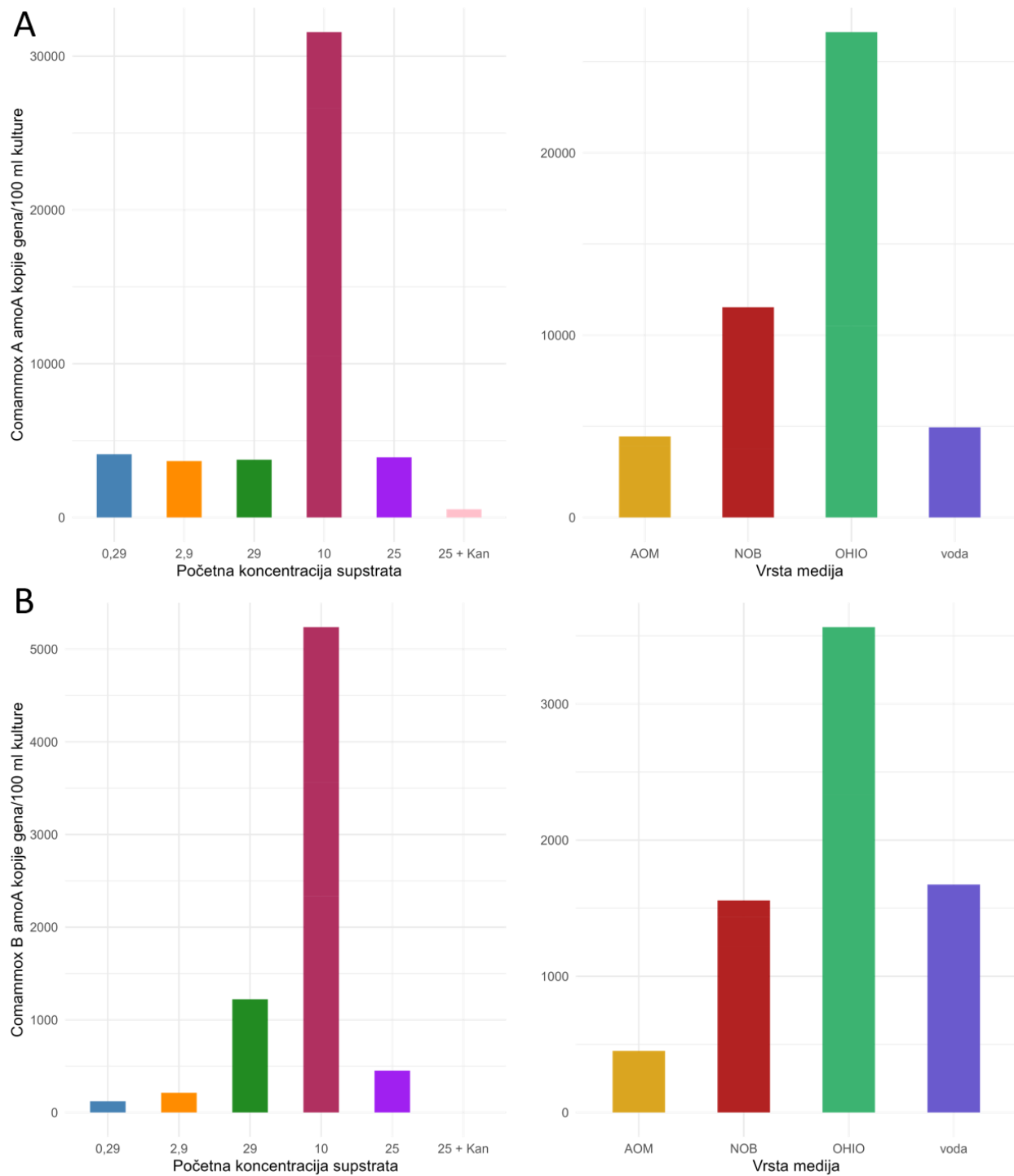
Rezultati korelacijske analize na bazi Spearman koeficijenta na uzorcima kultura ukazuju na potpunu pozitivnu korelaciju između *nxrA* i *nxrB* gena, dok je korelacija između comammox A *amoA* i comammox B *amoA* također vrlo izražena. Comammox A/B *amoA* geni pokazuju negativnu korelaciju s *nxrA* i *nxrB* genima u uzorcima kultura (Slika 41).



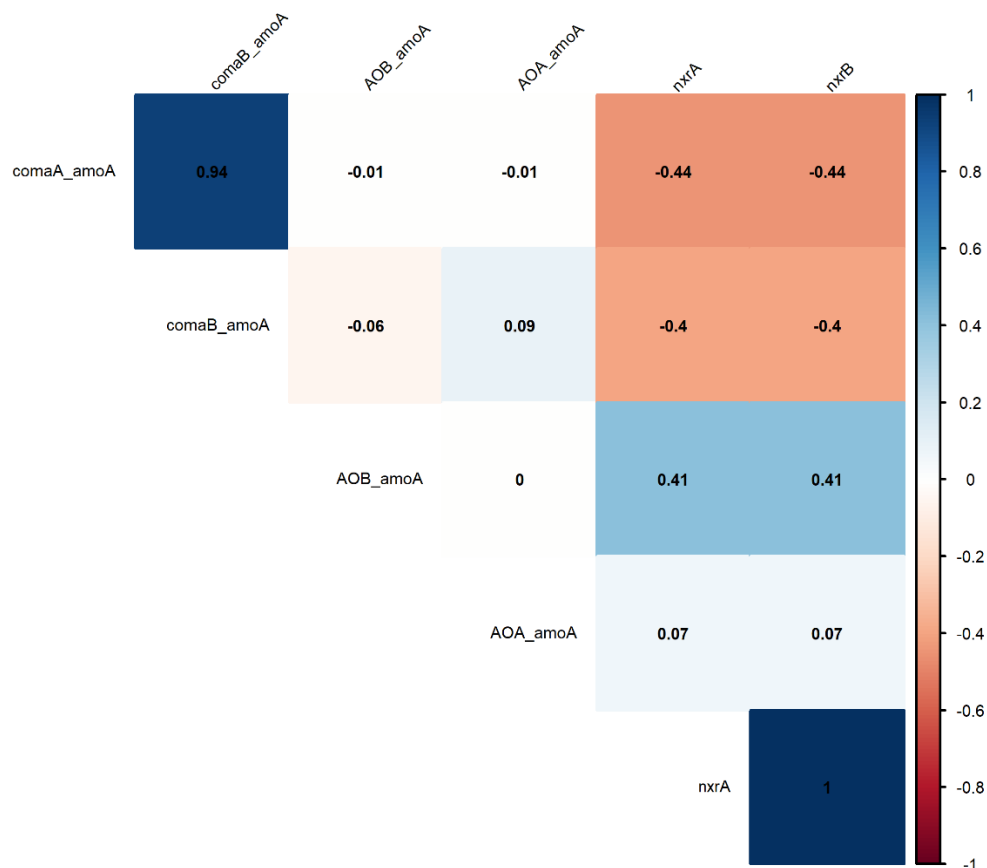
Slika 38. Broj kopija AOA *amoA* i AOB *amoA* gena karakterističnih za odvijanje oksidacije amonijaka u nitrit u procesu nitrifikacije u uzorcima kultura dobiveni qPCR analizom. Prikazana je srednja vrijednost broja kopija gena u triplikatu po različitim vrstama supstrata (mM) i medija.



Slika 39. Broj kopija *nxrA* i *nxB* gena karakterističnih za odvijanje oksidacije nitrita u nitrat u procesu nitrifikacije u uzorcima kultura dobiveni qPCR analizom. Prikazana je srednja vrijednost broja kopija gena u triplikatu po različitim vrstama supstrata (mM) i medija.



Slika 40. Broj kopija comammox A *amoA* i comammox B *amoA* gena karakterističnih za odvijanje procesa potpune nitrifikacije u uzorcima kultura dobiveni qPCR analizom. Prikazana je srednja vrijednost broja kopija gena u triplicatu po različitim vrstama supstrata (mM) i medija.



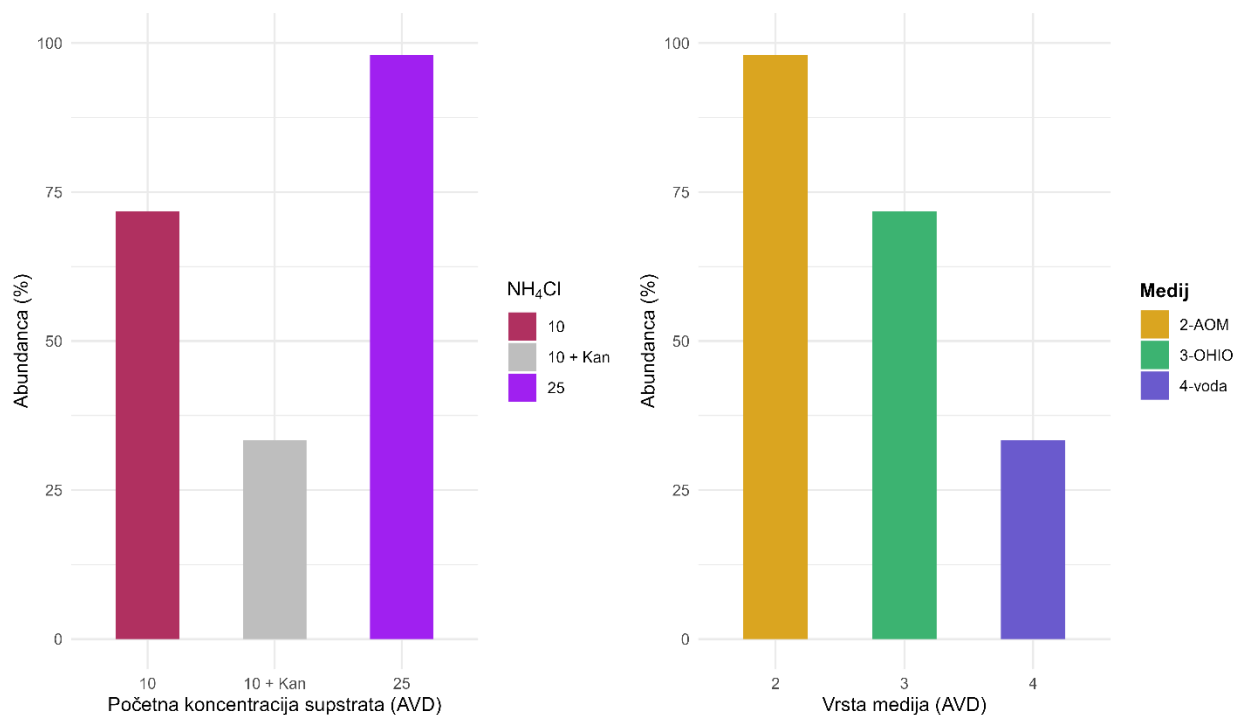
Slika 41. Korelacijska analiza (na bazi Spearman koeficijenta) kopija gena uključenih u reakcije nitrifikacije iz uzoraka kultura dobivenih qPCR analizom.

4.3.1.4.2. Najpovoljniji uvjeti uzgoja za pojavu mikrobne zajednice važne u ciklusu dušika po lokalitetima

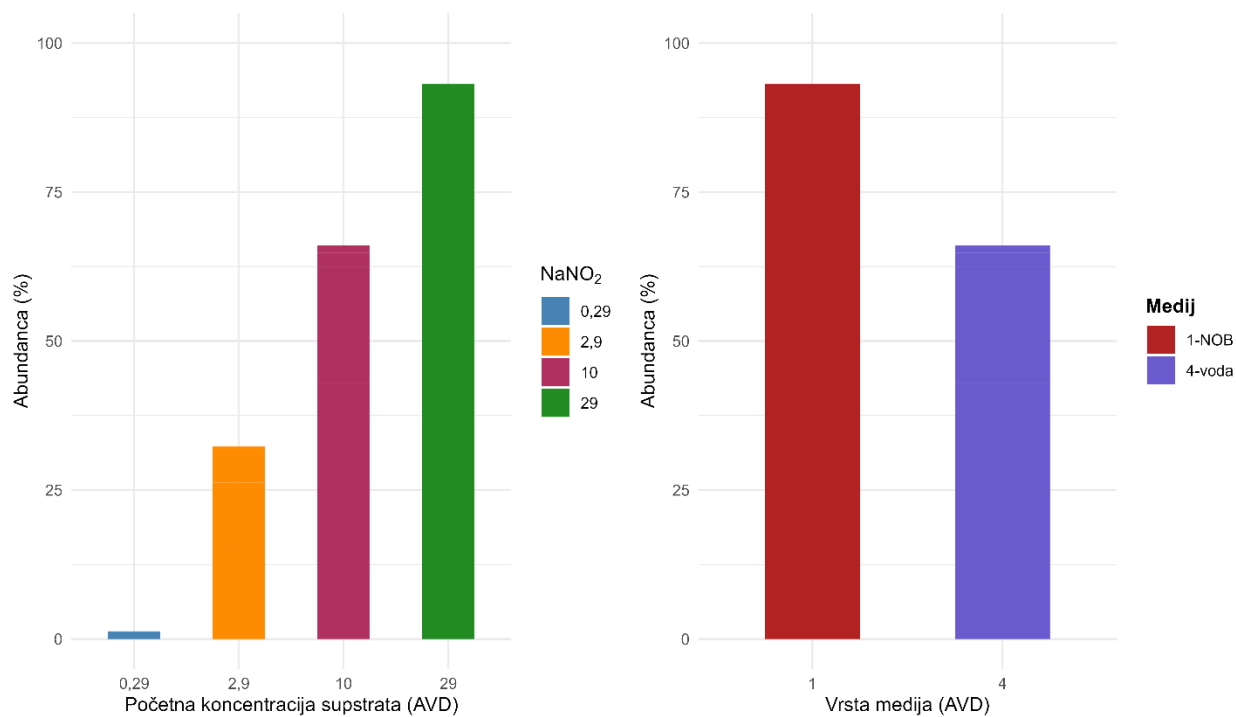
Proučavanjem ukupne zastupljenosti mikroorganizama na razini roda koji su uključeni u ciklus dušika u uzgojenim kulturama (Slika 33, 34, 35), primijećeno je da su mikroorganizmi s lokaliteta AVD najviše reagirali na početnu koncentraciju od 25 mM NH_4Cl u AOM mediju s niskom koncentracijom CaCO_3 (Slika 42), kao i na koncentraciju od 29 mM NaNO_2 u NOB mediju bez NH_4Cl (Slika 43). Više od 50 % zajednice mikroorganizama vezanih za ciklus dušika razvilo se i u OHIO mediju i izvornoj vodi lokaliteta AVD koja je služila kao medij, pri početnim koncentracijama od 10 mM $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NaNO}_2$ (Slika 42, Slika 43).

Značajan broj mikroorganizama s lokaliteta KRE razvio se na AOM mediju s niskom koncentracijom CaCO_3 s dodatkom supstrata početne koncentracije 25 mM NH_4Cl (Slika 44). S

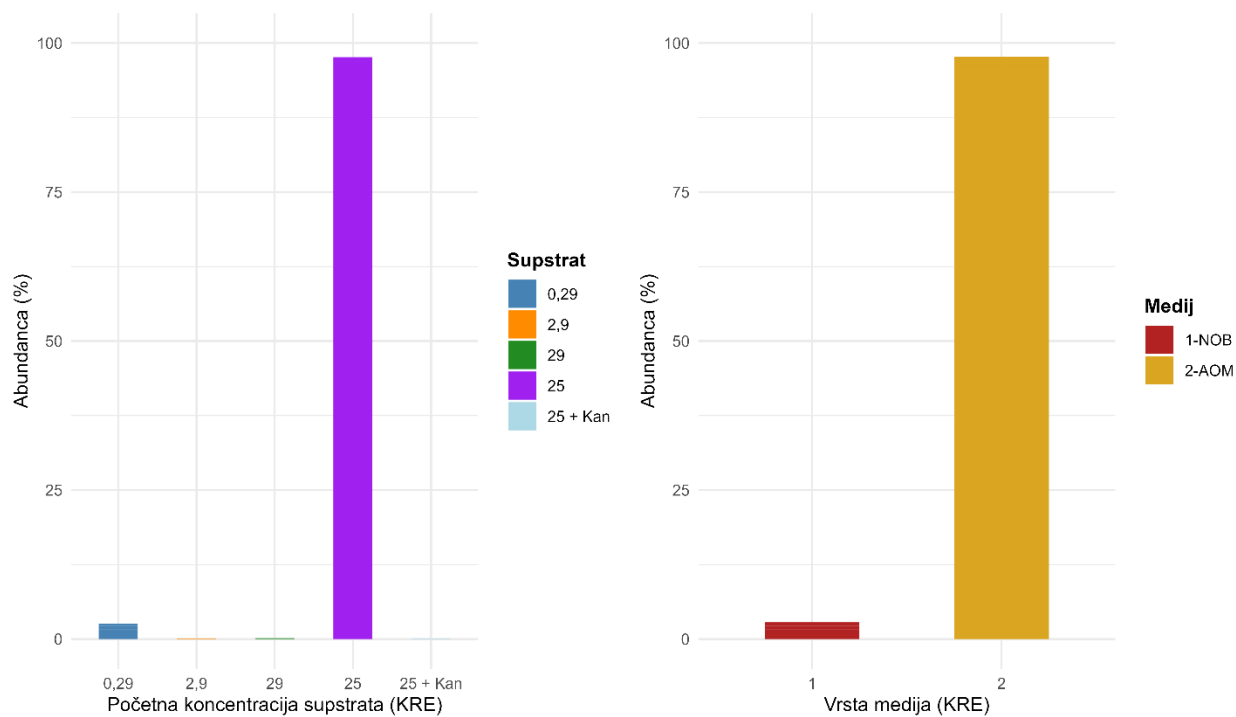
druge strane, mikroorganizmi s lokaliteta STU su pokazali podjednaku preferenciju za obje vrste medija i sve četiri koncentracije supstrata (0,29; 2,9; 29 mM NaNO₂ i 25 mM NH₄Cl), pri čemu je nešto više mikroorganizama bilo prisutno pri koncentraciji od 29 mM NaNO₂ na NOB mediju (Slika 45).



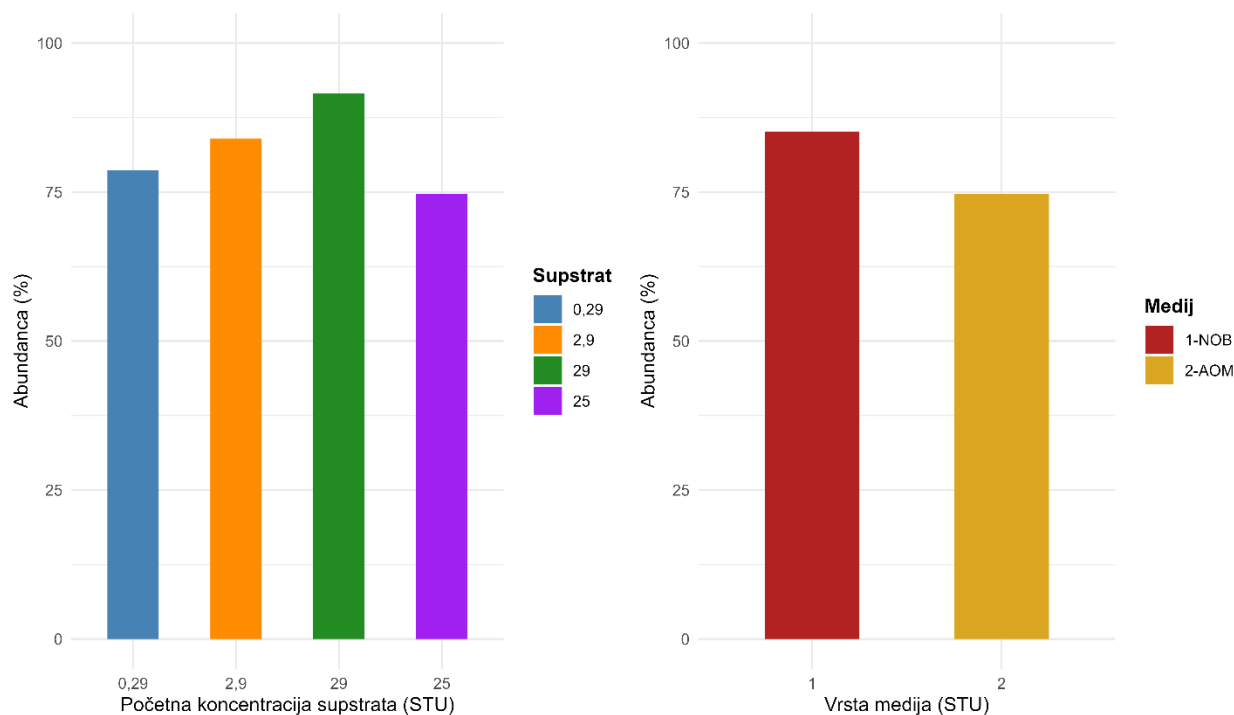
Slika 42. Prikaz relativne zastupljenosti svih pronađenih mikroorganizama vezanih za ciklus dušika na razini roda iz kultura lokaliteta AVD po pojedinom supstratu (mM NH₄Cl) i mediju.



Slika 43. Prikaz relativne zastupljenosti svih pronađenih mikroorganizama vezanih za ciklus dušika na razini roda iz kultura lokaliteta AVD po pojedinom supstratu (mM NaNO₂) i mediju.



Slika 44. Prikaz relativne zastupljenosti svih pronađenih mikroorganizama vezanih za ciklus dušika na razini roda iz kultura lokaliteta KRE po pojedinom supstratu (mM $\text{NaNO}_2/\text{NH}_4\text{Cl}$) i mediju.



Slika 45. Prikaz relativne zastupljenosti svih pronađenih mikroorganizama vezanih za ciklus dušika na razini roda iz kultura lokaliteta STU po pojedinom supstratu (mM $\text{NaNO}_2/\text{NH}_4\text{Cl}$) i mediju.

4.3.2. Biološka obrada procjedne vode biootpada

4.3.2.1. Fizikalno-kemijska svojstva procjedne vode biootpada tijekom biostimulacije i bioaugmentacije

U sva tri pokusa, od početnog pa sve do zadnjeg dana provođenja pokusa, mirisi eluata su se mijenjali od ugodnog i karakterističnog za biootpad do sve intenzivnijeg i kiselkastijeg mirisa. Tijekom 8. – 10. dana eluati su sve više poprimili miris citrusnih ostataka. Spektrofotometrijske vrijednosti boje mjerene pri 455 nm i 465 nm su se postupno povećavale te su eluati s vremenom postajali sve tamniji. Početni sadržaj vlage u svim pokusima iznosio je preko 60 %, dok je organski udio iznosio preko 90 %.

Tijekom biološke obrade procjedne vode biootpada temperatura je održavana na 25 °C u sva tri pokusa. Vrijednosti pH su s vremenom porasle, posebno od 3. dana, a njihov raspon je varirao od 4,7 do 8,4 u sva tri pokusa. Sličan trend rasta je zabilježen i u vrijednostima optičke

gustoće (OG) pri čemu su najviše vrijednosti izmjerene 4. i 6. dana u sva tri pokusa, nakon čega je uslijedio njihov pad. OG dodanih kultura u procjednu vodu biootpada iznosila je 0,020 za KRE (Pokus 2) te 0,041 za AVD (Pokus 3). TSS vrijednosti su imale sličan trend rasta i pada kao vrijednosti optičke gustoće. Vrijednosti električne vodljivosti (EC) su varirale u svim eksperimentima, no ipak su se razlikovale između pokusa gdje je kontrolni Pokus 1 imao nešto veće vrijednosti od Pokusa 2 i 3 (Tablica 16, Tablica 17, Tablica 18). Koncentracije otopljenog kisika varirale su po danima između pokusa, a međusobno ih veže nagli porast vrijednosti u periodu od 6. dana (Pokus 1 i 3), odnosno 7. dana (Pokus 2) te stagniranje vrijednosti od 8. do 10. dana. Osim kod O₂, ova stagnacija posljednjih dana uočena je prilikom mjerenja pH vrijednosti, EC, OG te vrijednosti KPK i TSS. Očekivano, vrijednosti KPK su se postupno smanjivale tijekom dana u sva tri pokusa, no nešto veći pad vrijednosti je zabilježen u pokusima s dodatkom egzogenih kultura u odnosu na kontrolu. Koncentracije nitrata su utvrđene samo četvrti dan u sva tri pokusa u periodu kada je OG bila najveća, a koncentracija otopljenog kisika niska. Koncentracije fosfata na početku su se postupno smanjivale sve do 8. ili 10. dana ovisno o pokusu, dok su koncentracije sulfata varirale između pokusa (Tablica 16, Tablica 17, Tablica 18).

Tablica 16. Stanje i sastav procjedne vode biootpada u Pokusu 1 (kontrola).

| | pH | EC ($\mu\text{S/cm}$) | OG | TSS (g/L) | O ₂ (mg/L) | KPK (mg/L) | NO ₃ ⁻ (mg/L) | PO ₄ ³⁻ (mg/L) | SO ₄ ²⁻ (mg/L) |
|----------------|------|----------------------------|-------|--------------|--------------------------|---------------|--|---|---|
| 1. dan | 4,73 | 3,47 | 1,086 | 0,72 | 4,26 | 11492 | 0 | 142,4571 | 134,484 |
| 2. dan | 4,76 | 3,26 | 2,570 | 1,91 | 0,08 | 9110 | 0 | 71,22855 | 134,484 |
| 3. dan | 7,22 | 3,26 | 3,159 | 2,53 | 2,14 | 5657 | 0 | 56,98284 | 153,696 |
| 4. dan | 7,55 | 3,34 | 9,397 | 2,60 | 1,39 | 3647 | 1,2649 | 20,89371 | 124,878 |
| 6. dan | 8,17 | 3,46 | 7,310 | 2,65 | 5,26 | 4362 | 0 | 5,498844 | 134,484 |
| 7. dan | 8,25 | 3,54 | 3,777 | 3,55 | 6,88 | 1106 | 0 | 4,036285 | 163,302 |
| 8. dan | 8,42 | 3,91 | 3,617 | 2,80 | 7,22 | 1149 | 0 | 7,692683 | 172,908 |
| 10. dan | 8,46 | 4,17 | 3,517 | 2,17 | 6,95 | 1263 | 0 | 5,156947 | 144,09 |

Tablica 17. Stanje i sastav procjedne vode biootpada u Pokusu 2 (s dodatkom mješavine egzogenih kultura lokaliteta KRE).

| | pH | EC ($\mu\text{S/cm}$) | OG | TSS (g/L) | O₂ (mg/L) | KPK (mg/L) | NO₃⁻ (mg/L) | PO₄³⁻ (mg/L) | SO₄²⁻ (mg/L) |
|----------------|-----------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|---|---------------------------------|--|---|---|
| 1. dan | 4,71 | 3,43 | 1,081 | 0,72 | 4,13 | 11492 | 0 | 113,9657 | 96,06 |
| 2. dan | 4,64 | 3,19 | 2,476 | 1,86 | 0,07 | 9337 | 0 | 94,9714 | 124,878 |
| 3. dan | 6,66 | 3,11 | 3,121 | 2,96 | 0,27 | 5840 | 0 | 37,98856 | 134,484 |
| 4. dan | 7,54 | 3,15 | 9,147 | 3,10 | 2,75 | 4013 | 0,787462 | 19,94399 | 134,484 |
| 6. dan | 7,78 | 3,27 | 8,138 | 3,70 | 2,85 | 4338 | 0 | 8,718375 | 144,09 |
| 7. dan | 8,18 | 3,16 | 4,703 | 3,57 | 6,47 | 1203 | 0 | 3,732376 | 163,302 |
| 8. dan | 8,40 | 3,27 | 4,578 | 2,90 | 7,28 | 1101 | 0 | 5,508341 | 163,302 |
| 10. dan | 8,27 | 3,31 | 3,910 | 2,43 | 6,69 | 1133 | 0 | 4,330696 | 144,09 |

Tablica 18. Stanje i sastav procjedne vode biootpada u Pokusu 3 (s dodatkom mješavine egzogenih kultura lokaliteta AVD).

| | pH | EC ($\mu\text{S/cm}$) | OG | TSS (g/L) | O₂ (mg/L) | KPK (mg/L) | NO₃⁻ (mg/L) | PO₄³⁻ (mg/L) | SO₄²⁻ (mg/L) |
|----------------|-----------|-----------------------------------|-----------|--------------------------------|---|---------------------------------|--|---|---|
| 1. dan | 4,71 | 3,43 | 1,235 | 0,72 | 3,98 | 11492 | 0 | 123,4628 | 124,878 |
| 2. dan | 4,88 | 3,15 | 2,720 | 2,26 | 0,08 | 9025 | 0 | 37,98856 | 96,06 |
| 3. dan | 7,32 | 3,09 | 4,819 | 3,40 | 3,11 | 4983 | 0 | 28,49142 | 115,272 |
| 4. dan | 7,35 | 3,17 | 9,003 | 3,80 | 0,85 | 3370 | 1,190494 | 12,34628 | 115,272 |
| 6. dan | 8,10 | 3,23 | 9,488 | 3,95 | 5,09 | 3737 | 0 | 0 | 153,696 |
| 7. dan | 8,10 | 3,26 | 5,057 | 3,83 | 6,49 | 1448 | 0 | 5,14745 | 163,302 |
| 8. dan | 8,41 | 3,24 | 4,460 | 2,83 | 7,28 | 1070 | 0 | 4,28321 | 172,908 |
| 10. dan | 8,31 | 3,27 | 4,043 | 2,28 | 6,83 | 1021 | 0 | 8,328992 | 124,878 |

Najizraženije pozitivne korelacije uočene su između pH vrijednosti i koncentracije otopljenog kisika te između TSS-a i OG u sva tri provedena eksperimenta (Prilog 9, Prilog 10, Prilog 11). Dodatno, u Pokusu 1 uočena je snažna pozitivna korelacija EC s koncentracijom

otopljenog kisika i pH (Prilog 9), dok je u Pokusu 2 zabilježena jaka pozitivna korelacija koncentracije sulfata s koncentracijom otopljenog kisika (Prilog 10). S druge strane, koncentracija nitrata pokazala je najslabiju pozitivnu korelaciju s većinom analiziranih parametara u sva tri pokusa, kao i neznčajnu negativnu korelaciju ili čak nepostojanje korelacije s ostatkom parametara (Prilog 9, Prilog 10, Prilog 11).

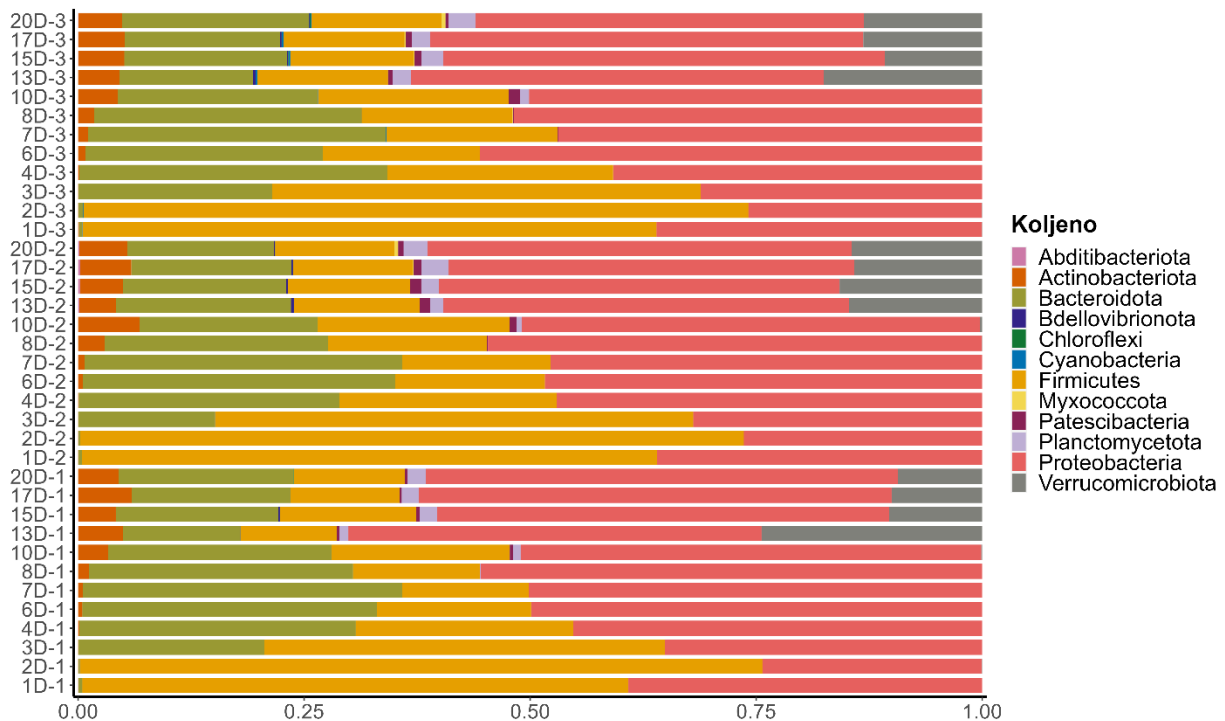
4.3.2.2. Struktura zajednice prokariota

Za analizu strukture prokariotske mikrobne zajednice u biološkoj obradi procjedne vode biootpada, provedeno je sekvenciranje 16S rRNA dijelova gena bakterija i arheja u ukupno 36 uzoraka (12 uzoraka po pokusu). Rezultati sekvenciranja obuhvaćali su ukupno 629 različitih svojti. Nakon primjene procedure filtriranja tijekom statističke obrade podataka, konačni „phyloseq” objekt sadržavao je taksonomsku tablicu s 391 svojtom u 36 uzoraka koja je dalje korištena za provođenje statističkih analiza. Najveći broj očitavanja zabilježen je u 13D - 3 uzorku ($n = 27\ 311$), dok je najmanji broj očitavanja imao 20D - 2 uzorak ($n = 7858$). Isti uzorak imao je identični najniži broj očitavanja na nefiltriranom setu podataka korišten prilikom procjene alfa raznolikosti kada su svi podaci nasumično svedeni na isti najmanji broj očitavanja.

Sastav prokariotske mikrobne zajednice u sva tri pokusa pokazao se izuzetno sličan, s nekim manjim varijacijama u zastupljenosti određenih svojti. Drugim riječima, struktura prokariotske zajednice u Pokusu 2 i 3, s dodatkom egzogenih kultura, nije se znatno razlikovala od kontrolnog Pokusa 1 (Slika 46). Tijekom vremena, brojnost pojedinih svojti je kontinuirano rasla u sva tri pokusa, što je posebno uočljivo u Pokusu 3 te u Pokusu 2 uz blage varijacije (Prilog 12). Za razliku od njih, kontrolni Pokus 1 karakterizira povećanje brojnosti vrsta s većom varijabilnošću tijekom različitih dana uzorkovanja (Prilog 12). Osim toga, Shannon i Simpson indeksi ukazuju na postupno povećanje raznolikosti vrsta kroz vrijeme, s naglim porastom raznolikosti od 3. dana u sva tri eksperimenta. Međutim, primijećeno je da je brojnost i raznolikost vrsta posljednjih dana uzorkovanja nešto veća u pokusima s dodatkom egzogenih kultura (posebice u Pokusu 3) u usporedbi s kontrolnim pokusom bez kultura (Prilog 12).

U 36 analiziranih uzoraka, identificirano je prisustvo ukupno 11 različitih prokariotskih koljena, pri čemu niti jedno koljeno nije pripadalo arhejama (Slika 46). Koljena Firmicutes, Proteobacteria i Bacteroidota su posebno zastupljena, posebno tijekom prvih 8 dana razgradnje

procjedne vode biootpada. Njihovi najzastupljeniji predstavnici uključuju rodove poput *Leuconostoc* koji je pokazao najveću dominaciju drugog dana (Firmicutes, 2D-1 – 32,8 %, 2D-2 – 30,9 %, 2D-3 – 29,7 %), kao i *Weissella* (Firmicutes, 2D-1 – 25,2 %, 2D-2 – 25,9 %, 2D-3 – 25,5 %), *Klebsiella* s najvećom dominacijom prvog dana (Gammaproteobacteria, 1D-1 – 24,1 %, 1D-2 – 21,4 %, 1D-3 – 21,7 %) i *Chryseobacterium* (Bacteroidota, 4D-3 – 21,1 %, 4D-1 – 17,5 %, 6D-2 – 17,1 %) s najvećom zastupljenošću u razdoblju od 4. do 6. dana (Prilog 13).



Slika 46. Relativna zastupljenost mikrobne zajednice prokariota na razini koljena identificiranih u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada. Oznake 1D – 20 D predstavljaju dane uzorkovanja po pokusima – 1 – Pokus 1 (kontrola), 2 – Pokus 2 (dodatak mješavine egzogenih kultura lokaliteta KRE), 3 – Pokus 3 (dodatak mješavine egzogenih kultura lokaliteta AVD).

Međutim, primijećeno je postupno smanjenje predstavnika koljena Firmicutes tijekom vremena. Pojava predstavnika koljena Actinobacteriota uočena je od 4. dana, dok su predstavnici koljena Verrucomicrobiota postali prisutni od 10. dana, pri čemu je najzastupljeniji predstavnik *Luteolibacter* (13D-1 – 21,9 %, 13D-2 – 9,5 %, 13D-3 – 14,1 %) (Slika 46, Prilog 13). Unatoč tim promjenama, predstavnici ovih koljena još uvijek ne nadmašuju dominaciju predstavnika

Proteobacteria i Bacteroidota u određenim uzorcima. Međutim, postupne promjene u zastupljenosti i dominaciji određenih svojti tijekom vremena rezultat su pojave različitih predstavnika unutar koljena Planctomycetota, Patescibacteria, Bdellovibrionota i Myxococcota od 10. dana uzorkovanja, iako u relativno malom postotku. Zastupljenost vrsta roda *Pseudomonas* postupno je rasla, s najvećom zastupljenošću u kontrolnom Pokusu 1 (15D-1 - 10,9 %, 17D-3 - 9,6 %, 15D-2 - 7,9 %). Vrste roda *Sphingobacterium* bile su najzastupljenije 7. i 8. dana (8D-3 - 14,4 %, 7D-2 - 13,6 %, 7D-1 - 12,9 %), dok je rod *Aeromonas* bio vrlo slabo zastupljen s maksimalnim udjelom od 0,01 - 0,02 % u svim pokusima (Prilog 13).

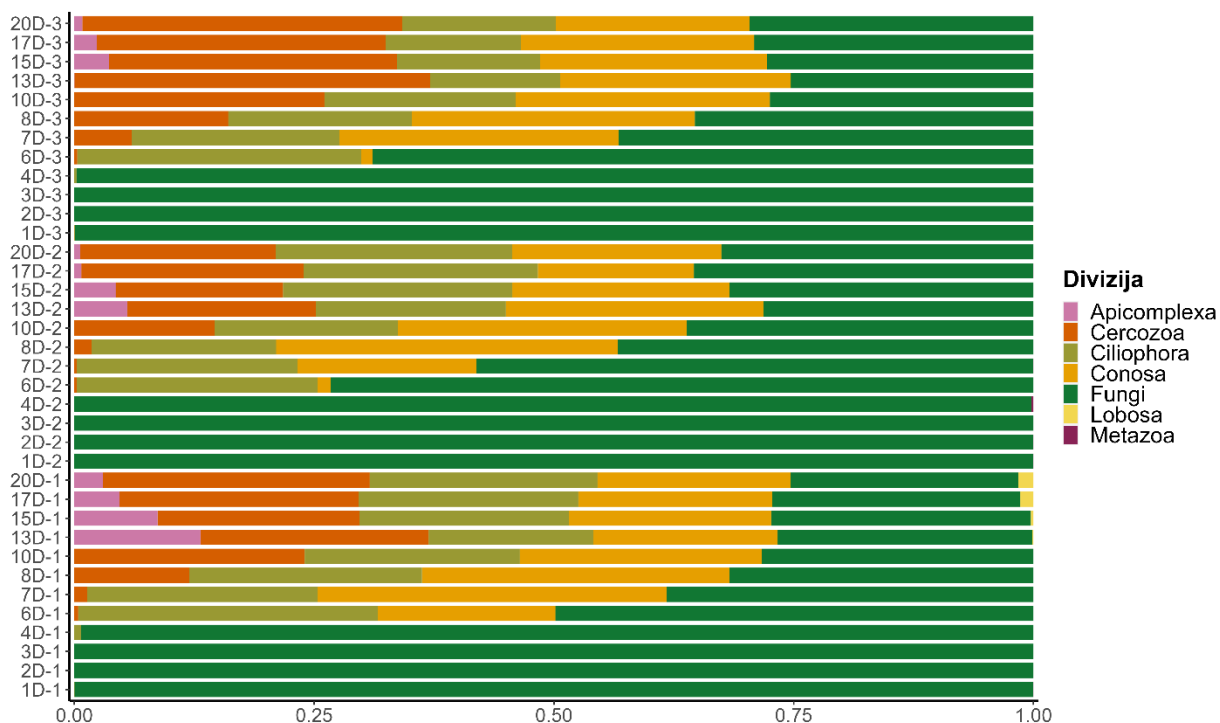
4.3.2.3. Struktura zajednice eukariota

Za analizu strukture eukariotske mikrobne zajednice u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada, provedeno je sekvenciranje 18S rRNA dijela gena u ukupno 36 uzoraka (12 uzoraka po pokusu). Rezultati sekvenciranja obuhvatili su ukupno 61 različitu taksonomsku svojtu. Nakon primjene filtriranja podataka, konačni “phyloseq” objekt sadržavao je taksonomsku tablicu s 47 svojti u 36 uzoraka, koji je dalje korišten za provođenje statističkih analiza. Najveći broj očitavanja zabilježen je u 15D - 3 uzorku ($n = 12\ 923$), dok je najmanji broj očitavanja imao 4D - 1 uzorak ($n = 4448$). Prije procjene alfa raznolikosti, podaci su usklađeni s brojem očitavanja jednakim uzorku s najmanjim brojem očitavanja u nefiltriranom skupu podataka (4D - 1, $n = 4448$).

Poput prokariotske zajednice, sastav eukariotske mikrobne zajednice u sva tri provedena pokusa pokazao se izrazito sličan, uz manje varijacije u zastupljenosti određenih svojti tijekom pojedinih dana te pojavu novih svojti u barem jednom od tri provedena eksperimenta. Analogno prokariotima, struktura eukariotske zajednice u Pokusu 2 i 3, s dodacima egzogenih kultura, nije značajno odstupala od kontrolnog Pokusa 1 (Slika 47). Tijekom vremena, brojnost vrsta je rasla u sva tri pokusa, s posebnim naglaskom na Pokus 3, uz blage fluktuacije posljednjih dana uzorkovanja (od 10. dana nadalje) (Prilog 14). Shannon i Simpson indeksi raznolikosti ukazuju na povećanje raznolikosti vrsta od početka uzorkovanja, s blagom varijabilnošću i stagnacijom u kasnijim fazama eksperimenta. Slično kao kod prokariota, primijećeno je da je ponekad raznolikost vrsta nešto veća u pokusima s egzogenim kulturama u usporedbi s kontrolnim pokusom, dok je situacija obrnuta pri usporedbi nekih drugih dana (Prilog 14).

Tijekom analize 36 uzoraka, uočeno je prisustvo ukupno 7 različitih eukariotskih divizija unutar 4 supergrupe (Alveolata, Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria). Najzastupljeniju zajednicu,

posebno tijekom prva četiri dana u sva tri pokusa, činili su predstavnici Fungi (Ascomycota – *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida* i *Galactomyces*) (Slika 47, Prilog 15). *Pichia* je uvelike dominirala prva četiri dana u sva tri pokusa, s udjelom većim od 50 %, dok je *Hanseniaspora* zauzimala udio od 20 do 40 % u prva tri dana. Nakon toga, primijećeno je postupno smanjenje njihove dominacije i pojava rodova *Galactomyces* i *Candida* koje su postale jedne od dominantnih vrsta od 4. dana do kraja eksperimenta.



Slika 47. Relativna zastupljenost mikrobne zajednice eukariota na razini divizije identificiranih u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada. Oznake 1 D – 20 D predstavljaju dane uzorkovanja po pokusima – 1 – Pokus 1 (kontrola), 2 – Pokus 2 (dodatak mješavine egzogenih kultura lokaliteta KRE), 3 – Pokus 3 (dodatak mješavine egzogenih kultura lokaliteta AVD).

Osim toga, smanjenjem prisutnosti *Pichia* i *Hanseniaspora*, pojavile su se i različite svojte unutar divizija Ciliophora (*Colpoda*, najbrojniji u 6D-1 – 30 %) Conosa (*Flamella*, najbrojnije u 7D-1 – 36,4 %) i Cercozoa (*Glissomonadida*, najbrojnije u 13D-3 – 37 %), pri čemu je njihova zastupljenost varirala kroz dane, a bile su među najdominantnijim vrstama (Slika 47, Prilog 15).

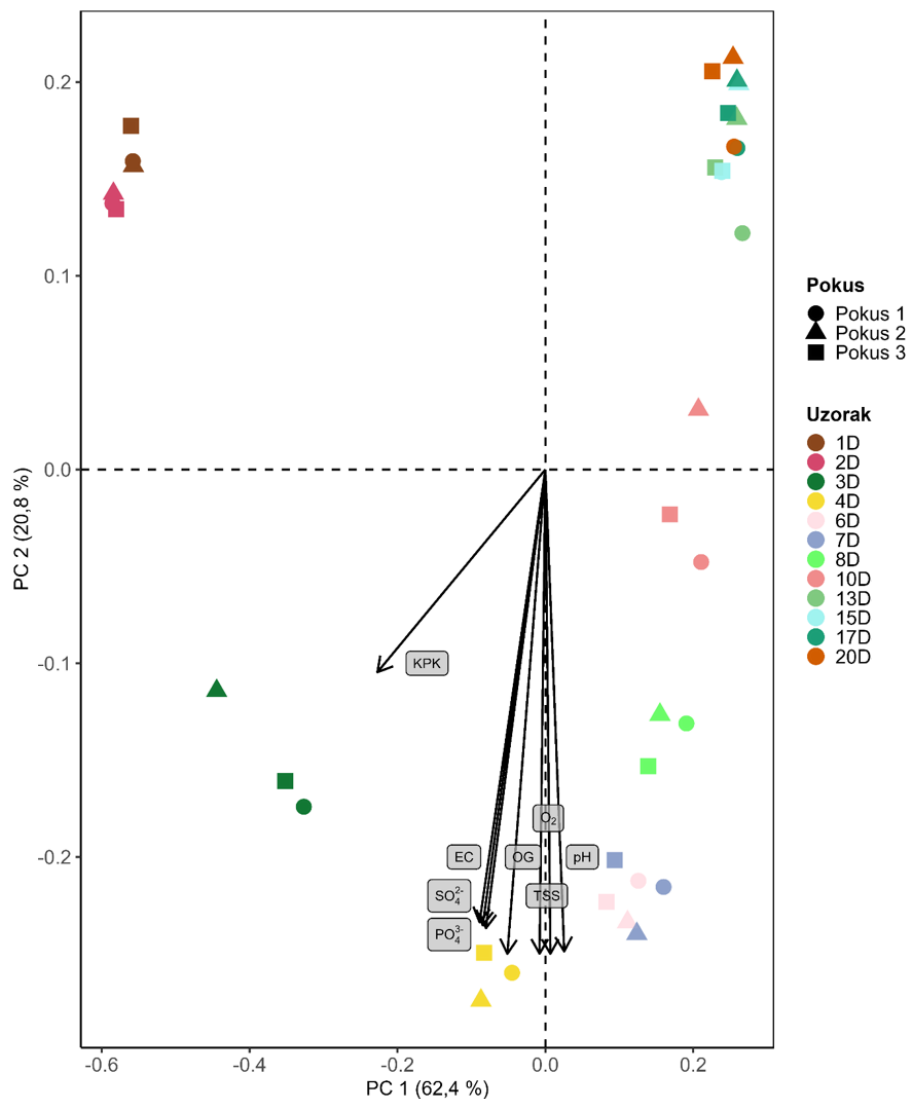
Od 13. dana u Pokusu 1 i Pokusu 2 uočeno je prisustvo predstavnika Apicomplexa (Coccidiomorpha), dok su se u Pokusu 3 pojavili 15. dana, iako su njihovi udjeli i dalje manji u usporedbi s drugim predstavnicima. U Pokusima 2 i 3 primijećeno je prisustvo predstavnika Metazoa (rod *Tubastraea*) tijekom nekih dana uzorkovanja, ali u vrlo malom postotku. Predstavnik Fungi, rod *Triparticalcar* pojavio se od 13. dana samo u Pokusu 3, a zapažen je rast njegove zastupljenosti (od 0,39 % do 4,6 %). Slična situacija dogodila se s rodom *Echinamoeba* (Lobosa) uočenom samo u Pokusu 1 od 13. do 20. dana (0,007 % do 1,6 %) (Prilog 15).

4.3.2.4. Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na strukturu prokariotske i eukariotske mikrobne zajednice tijekom biološke obrade procjedne vode biootpada

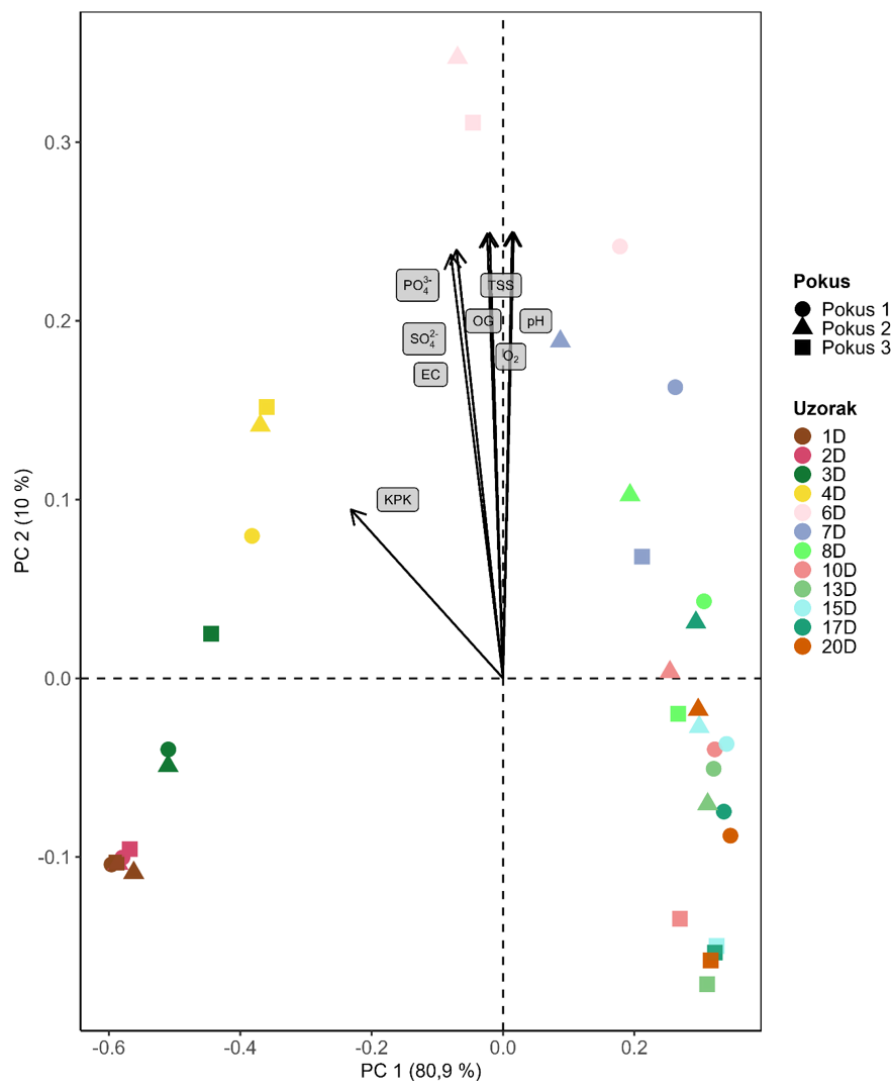
Primjenom PERMANOVA statističkog testa dobiveni su rezultati koji ukazuju na nedostatak značajnog utjecaja vrste pokusa (Pokus 1, Pokus 2, Pokus 3) na oblikovanje mikrobne zajednice prokariota ($p = 0,393$, $R^2 = 0,02691$) i eukariota ($p = 0,529$, $R^2 = 0,04596$). S druge strane, utvrđeno je da dani uzorkovanja imaju značajan utjecaj na mikrobnu zajednicu prokariota ($p = 0,001$, $R^2 = 0,40738$) i eukariota ($p = 0,001$, $R^2 = 0,53704$).

Također, primjenom PCoA analize koja se temeljila na proučavanju odnosa mikrobnih zajednica s ključnim fizikalnim parametrima (pH, TSS i OG), kao i utvrđenim koncentracijama kemijskih parametara (O_2 , KPK, PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , NO_3^-), primijećeno je da se uzorci grupiraju prema danima uzorkovanja, a ne prema vrsti pokusa (Slika 48, Slika 49). Iako je dominantno grupiranje temeljeno na danima uzorkovanja, primijećeno je djelomično preklapanje uzoraka prokariotske zajednice, posebno za 6. i 7. dan te za 13., 15., 17. i 20. dan (Slika 48).

Slična stvar primijećena je i kod eukariotske zajednice gdje se djelomično preklapaju uzorci 1. i 2. dana sva tri pokusa, 7. i 8. dan sva tri pokusa te uzorci Pokusa 1 i Pokusa 2 od 10. do 20. dana uzorkovanja (Slika 49). Zanimljivo je da su se uzorci Pokusa 3 od 10. do 20. dana ipak u potpunosti odvojili od istih dana preostala dva pokusa (Slika 48, Slika 49).



Slika 48. Analiza glavnih koordinata (PCoA) prokariotske mikrobne zajednice ograničene vrijednostima pH, EC, OG, TSS i KPK te koncentracijama O₂, SO₄²⁻ i PO₄³⁻. Tri različita oblika (pokusa) su uzorci obojeni po danima uzorkovanja. Polupravci predstavljaju značajan utjecaj ($p < 0,05$; PERMANOVA) analiziranih okolišnih parametara na prokariotsku mikrobnu zajednicu u pokusima biološke obrade procjedne vode biootpada.



Slika 49. Analiza glavnih koordinata (PCoA) eukariotske mikrobne zajednice ograničene vrijednostima pH, EC, OG, TSS i KPK te koncentracijama O_2 , SO_4^{2-} i PO_4^{3-} . Tri različita oblika (pokusa) su uzorci obojeni po danima uzorkovanja. Polupravci predstavljaju značajan utjecaj ($p < 0,05$; PERMANOVA) analiziranih okolišnih parametara na eukariotsku mikrobnu zajednicu u pokusima biološke obrade procjedne vode biootpada.

Većina analiziranih parametara ima značajan utjecaj na sastav mikrobne zajednice prokariota i eukariota (Tablica 19, Tablica 20). Rezultati PERMANOVA testa ukazuju da samo koncentracije NO_3^- nemaju statistički značajan učinak na strukturu prokariotske ($p = 0,919$, $R^2 = 0,6031$) (Tablica 19) i eukariotske mikrobne zajednice ($p = 0,367$, $R^2 = 0,09331$) (Tablica 20).

Parametri kao što su pH vrijednost, OG, TSS, koncentracija otopljenog kisika i fosfata, s obzirom na visoke zabilježene R^2 vrijednosti, mogu se smatrati ključnim faktorima koji su odgovorni za oblikovanje prokariotske i eukariotske mikrobne zajednice. No, važno je napomenuti da su i ostali analizirani parametri značajno utjecali na oblikovanje mikrobni zajednica u procesima razgradnje procjedne vode biootpada, kako pokazuju i sami rezultati ($p < 0,05$). Ovi rezultati ističu važnost svih ispitanih parametara za razumijevanje sastava mikrobne zajednice i njihove dinamike u procesima razgradnje biootpada i njegove procjedne vode.

Tablica 19. Vrijednosti PERMANOVA testa korištenog na analiziranim parametrima i mikrobnoj zajednici prokariota tijekom biološke obrade procjedne vode biootpada. Prikazani su parametri koji su pokazali statistički značajan utjecaj na strukturu prokariotske mikrobne zajednice ($p < 0,05$).

| Varijabla 1 | Varijabla 2 | PERMANOVA stat R^2 | p |
|--|----------------------------|----------------------|-------|
| Mikrobna zajednica prokariota | pH vrijednost | 0,87287 | 0,001 |
| | Električna vodljivost (EC) | 0,76257 | 0,002 |
| | Optička gustoća (OG) | 0,88588 | 0,001 |
| | TSS | 0,88121 | 0,001 |
| | O_2 | 0,8822 | 0,001 |
| | KPK | 0,49624 | 0,001 |
| | PO_4^{3-} | 0,83518 | 0,001 |
| | SO_4^{2-} | 0,6009 | 0,001 |

Tablica 20. Vrijednosti PERMANOVA testa korištenog na analiziranim parametrima i mikrobnj zajednici eukariota tijekom biološke obrade procjedne vode biootpada. Prikazani su parametri koji su pokazali statistički značajan utjecaj na strukturu eukariotske mikrobne zajednice ($p < 0,05$).

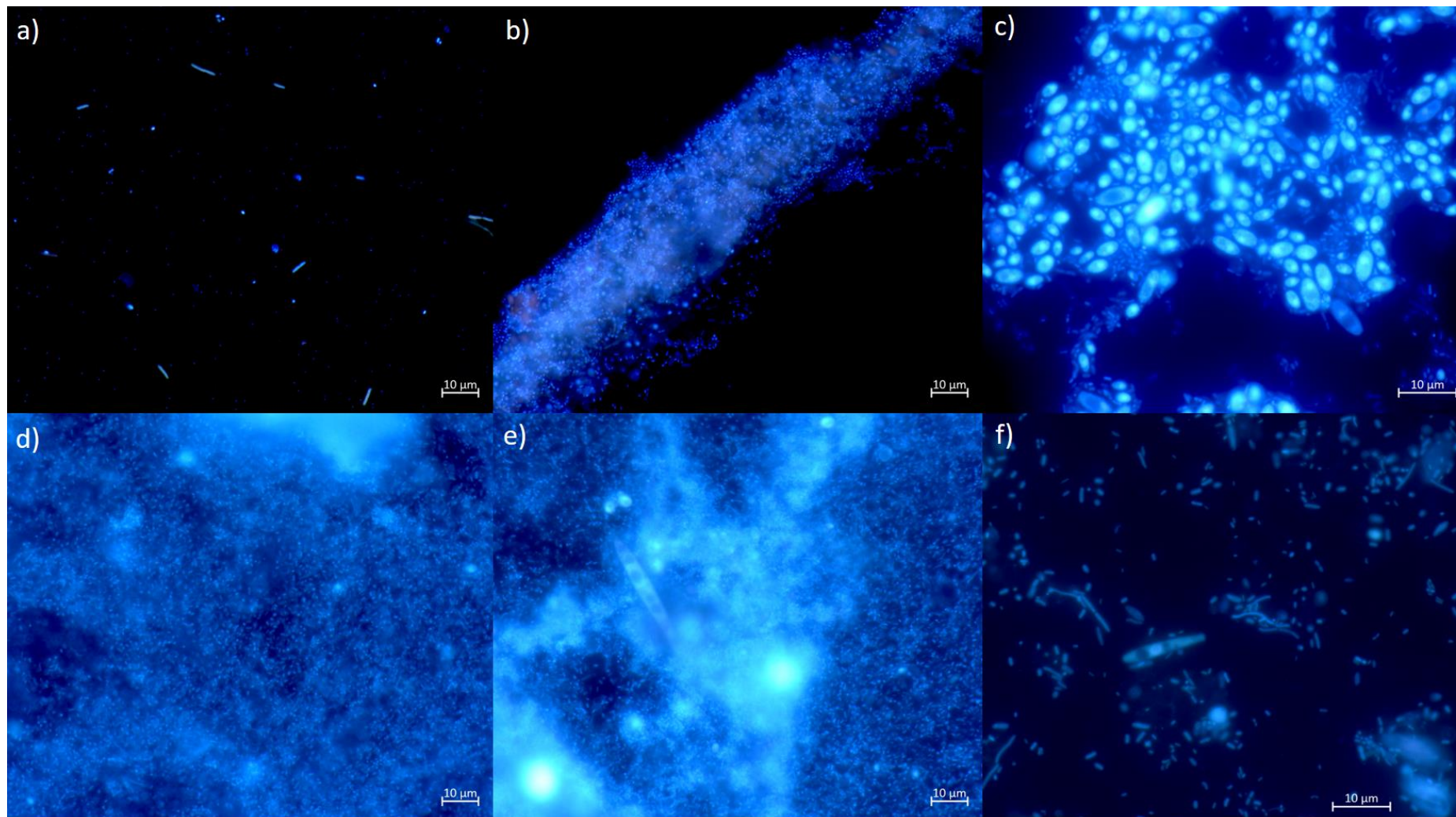
| Varijabla 1 | Varijabla 2 | PERMANOVA stat R^2 | p |
|-------------------------------------|-------------------------------|----------------------|-------|
| Mikrobna zajednica eukariota | pH vrijednost | 0,91488 | 0,001 |
| | Električna vodljivost (EC) | 0,81387 | 0,001 |
| | Optička gustoća (OG) | 0,92926 | 0,001 |
| | TSS | 0,91167 | 0,001 |
| | O ₂ | 0,9253 | 0,001 |
| | KPK | 0,62457 | 0,001 |
| | PO ₄ ³⁻ | 0,88785 | 0,001 |
| | SO ₄ ²⁻ | 0,64976 | 0,001 |

4.3.2.5. Prikaz sastava zajednice fluorescentnom mikroskopijom

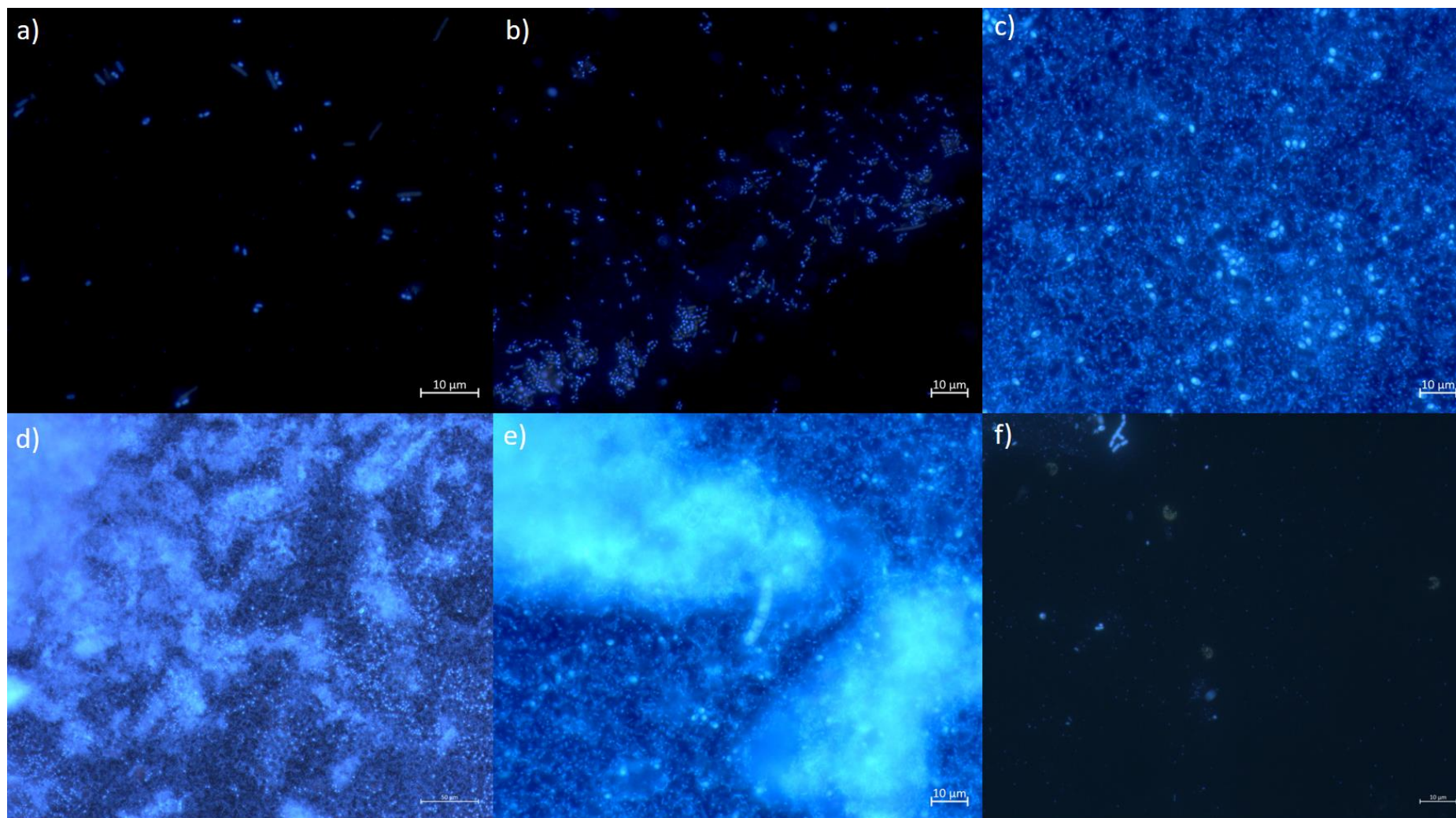
Rezultati fluorescentne mikroskopije su ukazali na značajan porast broja različitih prokariotskih mikroorganizama postupno po danima u svim provedenim pokusima, istovremeno s postupnom pojavom agregata („bijela magla“) koji predstavlja gustoću organske tvari (Slika 50, Slika 51, Slika 52). Osim toga, primijećeno je i postupno povećanje biomase raznih eukariotskih mikroorganizama (Slika 50 c, Slika 51 c, Slika 52 c). Ova povećanja odvijala su se paralelno s porastom vrijednosti OG i TSS.

Šestog (Pokus 2) ili sedmog dana (Pokus 1 i 3), uočene su dijatomeje, koje su se nastavile pojavljivati svakodnevno, lako uočljive zbog njihove veličine i karakterističnih oblika (Slika 50 e,f, Slika 51 e, Slika 52 e). Od otprilike 13. ili 15. dana, ovisno o pokusu, zabilježeno je smanjenje prokariota i eukariota te njihova stagnacija, iako je i dalje bila prisutna gusta biomasa, no njihove nakupine su bile manje izražene u usporedbi s prethodnim danima u svim provedenim eksperimentima.

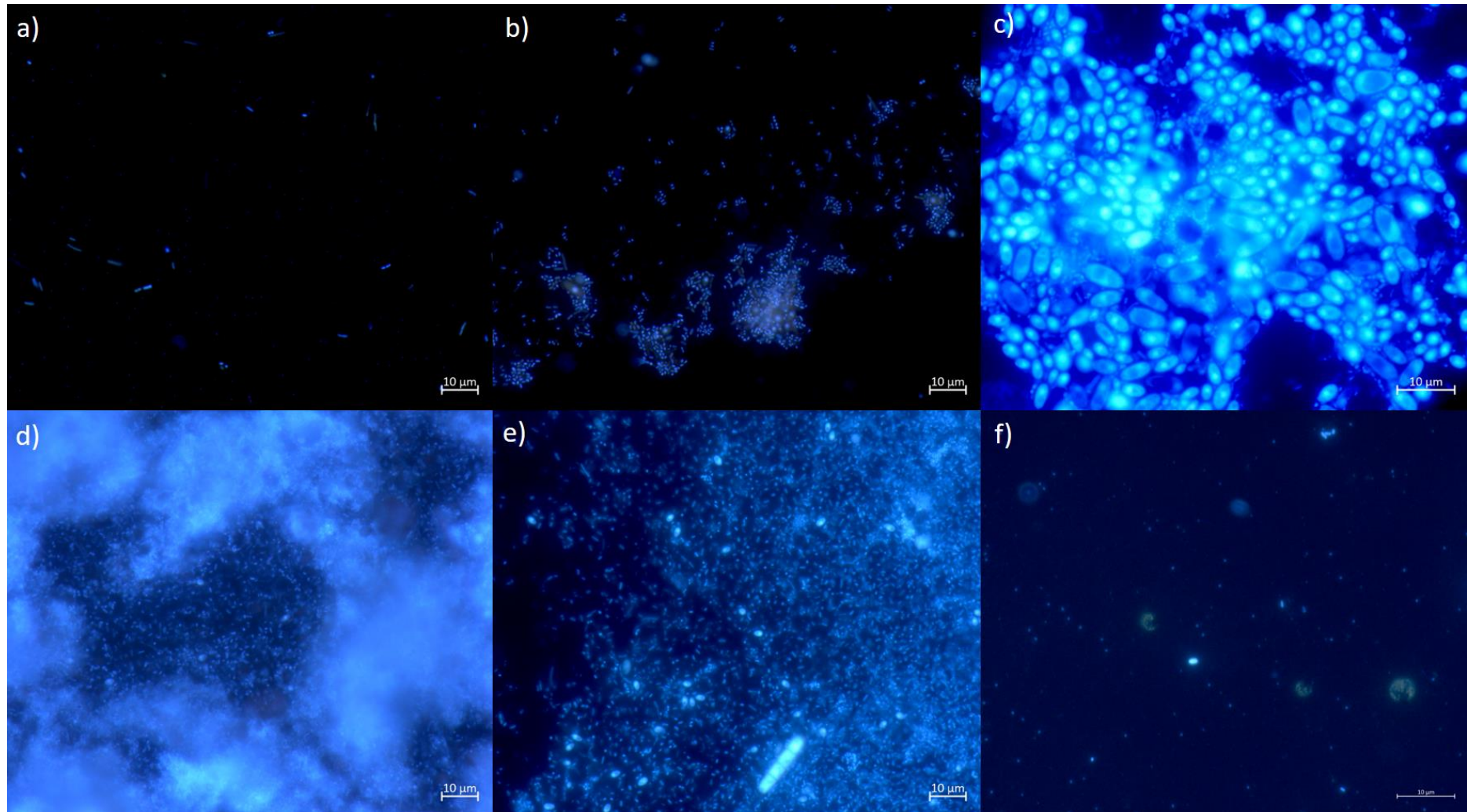
Različiti oblici prokariotskih i eukariotskih predstavnika su bili prisutni u svim pokusima, a organizmi karakterističnog oblika polumjeseca primijećeni su samo u Pokusima 2 i 3 tijekom 13. dana (Slika 51 f, Slika 52 f).



Slika 50. Kompozitne fluorescentne slike obojenih stanica prokariota i eukariota DAPI bojom iz Pokusa 1 (kontrola): a) 1. dan, b) 2. dan, c) 3. dan, d) 4. dan, e) 7. dan, f) 15. dan.



Slika 51. Kompozitne fluorescentne slike obojenih stanica prokariota i eukariota DAPI bojom iz Pokusa 2 (dodatak mješavine egzogenih kultura lokaliteta KRE): a) 1. dan, b) 2. dan, c) 3. dan, d) 4. dan, e) 6. dan, f) 13. dan.



Slika 52. Kompozitne fluorescentne slike obojenih stanica prokariota i eukariota DAPI bojom iz Pokusa 3 (dodatak mješavine egzogenih kultura lokaliteta AVD): a) 1. dan, b) 2. dan, c) 3. dan, d) 4. dan, e) 7. dan, f) 13. dan.

5. RASPRAVA

5.1. Prva faza istraživanja

5.1.1. Temperatura, pH vrijednost i nutrijenti kao najznačajniji parametri oblikovanja mikrobne zajednice prokariota

Geotermalne vode su ekstremna staništa prvenstveno definirana i ograničena povišenom temperaturom (Amin i sur., 2017; Cole i sur., 2013). Rezultati dobiveni ovim istraživanjem ukazuju da temperatura igra značajnu ulogu prilikom formiranja prokariotske mikrobne zajednice. Slični rezultati već su ranije objavljeni i za druge geotermalne vode diljem svijeta (Guo i sur., 2020). Posebne prilagodbe koje su razvile termofilne bakterije i arheje omogućuju im preživljavanje u ekstremnim uvjetima povišene temperature (Brock, 1964; Jaenicke i Sterner, 2006).

Međutim, temperatura nije jedini parametar koji je utjecao na mikrobnu raznolikost prokariota u geotermalnim vodama Hrvatske. Koncentracije dušikovitih (NO_3^- , NH_4^+ i TN) i sumpornih (SO_4^{2-} i H_2S) spojeva imaju snažan utjecaj na sastav mikrobne zajednice prokariota ovisno o mjestu uzorkovanja, baš kao i temperatura (Tablica 12). Kako je i pretpostavljeno u hipotezama, kombinacija temperature i pH vrijednosti skupa s dostupnosti hranjivih tvari poput dušika i sumpora determinirajući su modifikatori utvrđenih zajednica bakterija i arheja. Na mjestima uzorkovanja gdje su koncentracije NO_3^- , NH_4^+ i TN bile veće, koncentracije SO_4^{2-} i H_2S bile su niže, i obrnuto (Tablica 12), pokazujući zanimljivu dihotomiju između geotermalnih lokaliteta u kojima dominiraju spojevi dušika i sumpora, što je značajno utjecalo na oblikovanje sastava i strukture mikrobne zajednice prokariota. Slična opažanja zabilježena su i u drugim radovima gdje je temperatura zajedno sa koncentracijom sumpornih ili dušikovitih spojeva predstavljala ključne čimbenike prilikom oblikovanja strukture prokariotske mikrobne zajednice (Cordero i Datta, 2016; Huang i sur., 2021; Lagostina i sur., 2021).

Utvrđene pozitivne korelacije između izmjerenih parametara bile su očekivane. Nasuprot tome, nije bila prisutna značajna korelacija između parametara nutrijenata, temperature i pH vrijednosti (Slika 9).

5.1.2. Analiza strukture mikrobne zajednice prokariota

Geotermalne vode, kao i drugi ekosustavi, predstavljaju središnja područja kruženja biogeokemijskih elemenata poput transformacije ugljika, dušika i sumpora kojima upravljaju različite mikrobne populacije u brojnim interakcijskim odnosima. Najbitniji proces za odvijanje života je primarna produkcija koja je povezana s aktivnošću fitoplanktona, njihovom fiksacijom

CO₂ tijekom procesa fotosinteze i proizvodnjom organske tvari (Medeiros i sur., 2017). Na mnogim geotermalnim lokalitetima diljem svijeta, pa tako i u Hrvatskoj, važan dio mikrobne zajednice jesu termofilni predstavnici koljena Cyanobacteria koje se pojavljuju povremeno u analiziranim uzorcima i jedino pokazuju kontinuiranu visoku zastupljenost u SJA (Skupina 1, Slika 10) i IVD (Skupina 3, Slika 10). Osim cijanobakterija, pronađeni su i drugi fototrofi poput predstavnika koljena Chloroflexi. Ovi pronađeni termofili kroz odvijanje procesa primarne produkcije pridonose nutritivnoj interakciji mikroorganizama u geotermalnim vodama (Narsing Rao i sur., 2021) te ukazuju na značajnost primarne produkcije u hranidbenoj mreži (Ye i sur., 2015). Isto tako, predstavnici koljena Altiarchaeota značajno zastupljeni u SVM jesu autotrofne arheje koje često stvaraju biofilmove te predstavljaju tzv. „carbon sink“ (akumulacija ugljičnih spojeva i uklanjanje CO₂ iz atmosfere), važan dio ciklusa ugljika (Dombrowski i sur., 2019).

Proučavanjem rezultata alfa raznolikosti uočena je visoka bioraznolikost vrsta u geotermalnim vodama na temelju ujednačenosti svojiti i broja različitih vrsta u uzorku (Slika 11). Kao i u drugim geotermalnim vodama istraživanim diljem svijeta, u geotermalnim vodama Hrvatske obično su zastupljeni predstavnici koljena Proteobacteria, Campylobacterota, Crenarchaeota, Bacteroidota, Firmicutes, Nitrospirota i Cyanobacteria koji su često utvrđeni i kao najdominantnije svojite (Lebedeva i sur., 2005; Huang i sur., 2013; Sahoo i sur., 2015; Saxena i sur., 2017; Sharma i sur., 2017; Narsing Rao i sur., 2021). Na nekim istraživanim lokalitetima, temperatura vode nije bila jako povišena, a iznenađujuće je otkriće da su i u takvim geotermalnim vodama dominirali termofili i hipertermofili koje obično pronalazimo u staništima s ekstremnom temperaturom (> 60 °C), kao što su predstavnici koljena Crenarchaeota (*Nitrosocaldus*), Firmicutes (*Thermodesulfatimonas*, *Thermoanaerobacter*), Nitrospirota (*Thermodesulfobivrio*), Deinococcota (*Deinococcus*, *Thermus* i *Meiothermus*) i Desulfobacterota (*Thermodesulfobacterium*) (Hatzenpichler i sur., 2008; Huang i sur., 2011; Tobler i Benning, 2011; Bowen De León i sur., 2013; Urbietta i sur., 2014; Urbietta i sur., 2015; Panda i sur., 2016; Saxena i sur., 2017; Sharma i sur., 2017; Power i sur., 2018; Castelán-Sánchez i sur., 2019; Saghatelyan i sur., 2021; Najar i sur., 2022). Ipak, sukladno rezultatima abiotičkih čimbenika, sastav većine prokariotske zajednice istraživanih geotermalnih voda u Hrvatskoj može se opisati kao dominacija mezofilnih do umjereno termofilnih nitrifikacijskih mikroorganizama (AOA i *Nitrospira*) (Daims i sur., 2015; Daims i Wagner, 2018) ili dominacija mezofilnih do termotolerantnih mikroorganizama koji oksidiraju sumpor (SOB - Campylobacterota i γ -Proteobacteria) (Slika 10, Prilog 2). U dominantnu

porodicu Nitrosocaldaeae pripadaju poznati termofilni AOA predstavnici, dok su predstavnici porodice Nitrososphaeraceae mezofilni do umjereno termofilni AOA. Rod *Candidatus Nitrosotenuis* pripada porodici Nitrosopumilaceae koja sadržava mezofilne do umjereno termofilne slatkovodne AOA predstavnike (Abby i sur., 2020). Poznato je da sekvence povezane s rodom *Nitrospira* sadrže bakterije koje oksidiraju nitrit (NOB), kao i potpune oksidante amonijaka (comammox organizme) (Daims i Wagner, 2018). Sukladno tome, kombinacija dominantnih okolišnih parametara skupa sa biogeografijom, kao i potencijalnim biološkim interakcijama između pronađenih mikroba odigrala je ključnu ulogu u oblikovanju prokariotske mikrobne zajednice.

Prisutnost i visoka relativna brojnost SOB u mnogim analiziranim izvorima i bušotinama (Slika 10) bili su donekle kontradiktorni statističkom relativno malom utjecaju koncentracije sulfida na sastav mikrobne zajednice. Međutim, SOB su za razliku od oksidanata NH_4^+ i NO_2^- , filogenetski iznimno raznolika funkcionalna skupina (Friedrich i sur., 2001). Poznato je da i u drugim staništima, a ne samo geotermalnim vodama, filogenetski različite skupine SOB zauzimaju različite ekološke mikro-niše (Pjevac i sur., 2014) u kojima istjeravaju jedna drugu iz staništa prije nego da žive skupa u konzorciju (Pjevac i sur., 2015). Predstavnici različitih rodova SOB kao što su *Sulfuricurvum* (porodica Sulfurimonadaceae), *Sulfurovum* (porodica Sulfurovaceae), *Thiobacillus* (porodica Hydrogenophilaceae) ili *Thiofaba* (porodica Halothiobacillaceae) dominiraju u različitim geotermalnim izvorima (Slika 10), pri čemu se ukazuje na utjecaj sulfida na strukturu mikrobne zajednice prokariota. Na drugim geotermalnim lokalitetima u svijetu, dostupnost/koncentracija dušikovih i sumpornih spojeva pokazala se kao vrlo važan abiotički čimbenik koji pridonosi razlikama u zajednici prokariota između izvora (Schink, 2002; Cordero i Datta, 2016; Huang i sur., 2021; Lagostina i sur., 2021). Pretpostavlja se da je to i ovdje jednim dijelom odgovorno za naizgled međusobno isključiv razvoj oksidanata $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ u odnosu na oksidante sumpora u uzorcima geotermalne vode analizirane u ovom istraživanju (Skupina 1 naspram Skupine 3; Slika 10, Prilog 2, Slika 14).

Prethodna istraživanja ukazala su na dobru prilagođenost predstavnika koljena Firmicutes uvjetima staništa poput povećanog saliniteta s dostupnom niskom koncentracijom hranjivih tvari (Kambura i sur., 2016). Visoka relativna zastupljenost koljena Firmicutes utvrđena je ovdje na nekim od lokaliteta s visokom koncentracijom iona Na^+ i Cl^- (SVM, ZGB, ZGM i BIZ, Tablica 12,

Slika 10), što ukazuje na sličan adaptivni potencijal kao u drugim osmotski ekstremnim okruženjima.

Micrarchaeota je koljeno bogato acidofilnim heterotrofnim mikroorganizama s ograničenim i još uvijek slabo proučenim metaboličkim potencijalom (Baker i sur., 2010; Winkler i sur., 2021). Unatoč neutralnoj pH vrijednost DAB uzoraka, visoka učestalost reda Micrarchaeales u ovim uzorcima usmjerena je prema nešto nižim pH vrijednostima koje vjerojatno prevladavaju u dubljim dijelovima geotermalnih vodonosnika. Slično tome, Woearchaeales predstavljaju red još uvijek dosta neistraženih heterotrofnih arheja, široko rasprostranjenih u vodenim staništima, za koje se trenutno pretpostavlja da imaju simbiotski ili parazitski način života zbog njihovog metabolički neistraženog genomskog sadržaja (Castelle i sur., 2015).

5.1.3. Prostorno – vremenske razlike geotermalnih voda u Hrvatskoj

Najveći utjecaj na sastav zajednice imalo je mjesto uzorkovanja, a jedini testirani faktor koji nije pokazao nikakav učinak na oblikovanje zajednice prokariota bila je sezona uzorkovanja (Slika 12, Prilog 2). Stoga, sastav mikrobne zajednice prokariota u geotermalnim vodama Hrvatske može se opisati kao visoko specifičan za lokalitet, donekle stabilan kroz sezone i teško predvidljiv na temelju fizikalno-kemijskih svojstava vode.

Zanimljivo je da su daljnjom analizom temeljenom na vrsti vodonosnika mikrobne zajednice pokazale jak utjecaj biogeografije (Slika 14, Slika 15). Iako je vrsta vodonosnika utjecala na strukturu prokariotske zajednice, uočene su razlike između nekih lokaliteta koji pripadaju istoj skupini vodonosnika. Drugim riječima, uzorci kojoj pripadaju istoj skupini vodonosnika imali su razlike u zastupljenosti pojedinih vrsta, no dominantni predstavnici u većini uzoraka bili predstavnici koljena Proteobacteria, Campylobacterota, Crenarchaeota, Cyanobacteria, Firmicutes i Nitrospirota, što ukazuje na činjenicu da se bez obzira na vrstu vodonosnika, život u ekstremnim staništima poput geotermalnih voda ne razlikuje toliko.

Dok su mikrobne zajednice između mjesta uzorkovanja bile više različite jedna od druge nego što se očekivalo, longitudinalno (sezonsko) prikupljanje uzoraka pokazalo je da su zajednice većine analiziranih geotermalnih voda vremenski stabilne kroz godišnja doba (proljeće i jesen) i godine (2019. i 2020.) (Slika 10, Slika 13, Prilog 2). Slično saznanje mikrobne dinamike točnije stabilnosti iz godine u godinu zabilježeno je i u Grčkoj proučavajući druge geotermalne izvore i bušotine na geotermalnom polju Balkanskog poluočeka (Meziti i sur., 2021). Ovo saznanje je u

oštroj suprotnosti s drugim geotermalnim staništima diljem svijeta, kao što su geotermalne vode u Tengchongu (Briggs i sur., 2013) ili gejziri u Nacionalnom parku Yellowstone (Fecteau i sur., 2021) gdje se zabilježilo dosta sezonskih varijacija.

Geotermalne vode često karakterizira gubitak topline miješanjem geotermalne vode sa slatkovodnom i morskom vodom (obalni izvori) ili miješanjem duboke termalne vode s meteorskom vodom (Meziti i sur., 2021). U ovom istraživanju, uglavnom su proučavane geotermalne vode koje su pokazale malu varijabilnost u kemijskom sastavu tijekom tri sezone uzorkovanja (Slika 12, Tablica 12), iako im je retencijsko vrijeme > 4000 godina (Marković i sur., 2015; Marković i sur., 2022). To pokazuje da većina proučavanih geotermalnih voda u Hrvatskoj nije pod utjecajem vanjskih uvjeta okoliša, slično kao i u istraživanim geotermalnim lokalitetima u Grčkoj (Meziti i sur., 2021). Drugim riječima, zbog karakteristika mjesta uzorkovanja, kao što su duboke cijevi bušotina i potpuno zatvoreni (kaptirani) lokaliteti koji smanjuju mogućnost vanjskih utjecaja na svojstva vode (meteorska voda i drugi različiti vremenski uvjeti), uočena fizikalno-kemijska stabilnost je očekivana. Osim toga, uglavnom zbog iskorištavanja istraživanih lokaliteta u balneološke svrhe ili za potrebe grijanja staklenika te pojedinih dijelova grada (Prilog 1), većina geotermalnih izvora i bušotina u Hrvatskoj dobro je ograđena, zaključana i zaštićena od drugih mogućih antropogenih utjecaja koji bi mogli imati potencijalni učinak na fizikalno-kemijska svojstva vode, a time i na strukturu mikrobne zajednice prokariota.

U otvorenim (nekaptiranim) izvorima (SJA i TUH) očekivana je stabilnost fizikalno-kemijskih svojstava vode zbog jakih i stabilnih karakteristika podzemne vode na mjestima gdje se nalaze izvori. Samo je uzorak IVD (proljeće 2020) ukazivao na varijacije u temperaturi i koncentracijama DOC (Tablica 12) gdje su donekle utvrđeni učinci djelovanja godišnjih doba. Smatra se da je ovome nekaptiranom izvoru Daruvarskih toplica, izgled bare s velikom mogućnošću antropogenog utjecaja, razlog zašto je zastupljenost predstavnika Bacteroidota visoka tijekom svih sezona uzorkovanja za razliku od drugih uzorkovanih izvora (Prilog 2). Na ovom mjestu uzorkovanja može doći do miješanja meteorske vode s termalnom vodom, što može utjecati na strukturu zajednice i posljedično na visoku zastupljenost predstavnika Bacteroidota, koji bi mogli potjecati iz meteorske vode. Manja zastupljenost koljena Bacteroidota zabilježena je u drugim istraživanim geotermalnim izvorima diljem svijeta (Li i sur., 2016). Kormas i suradnici (2009) pokazali su da je miješanje meteorske i geotermalne vode jedan od čimbenika koji utječe na razvoj različite prokariotske zajednice i njihove brojnosti. Isto tako, jedan od mogućih razloga

razlika u fizikalno-kemijskim parametrima za IST uzorke (Slika 12) može biti posljedica miješanja termalne vode s „hladnom“ vodom iz drugog vodonosnika u blizini koja služi za piće i navodnjavanje poljoprivrednih područja.

5.1.4. Analiza pretpostavljenih metaboličkih funkcija prokariota u geotermalnim vodama Hrvatske

Jasna podjela geotermalnih izvora i bušotina Hrvatske prema nutrijentima, utjecala je i na podjelu prema mogućim metaboličkim funkcijama istraživanih staništa (Slika 16). Zahvaljujući pronađenim predstavnicima vezanim za N i S cikluse, postojećoj literaturi o njihovoj detaljnoj fiziologiji te funkcionalnim predviđanjem uz pomoć Tax4Fun analize (Slika 16), geotermalne vode u Hrvatskoj mogle bi proizvoditi širok raspon enzima bakterija i arheja koji se intenzivno koriste u biotehnoškim primjenama, kao što su procesi bioremedijacije (AOA, AOB, NOB, comammox, SOB, SRB) zbog identificiranih ciklusa dušika i sumpora kao najviše pretpostavljenih metaboličkih puteva (Jian Luo i sur., 2011; Li i sur., 2016; Dalcin Martins i sur., 2022). Osim navedenih, ciklus ugljika zasigurno je jedan od glavnih metaboličkih puteva i u ovoj geotermalnoj mikrobnj petlji, vrlo važan za život mikroba čijim metaboliziranjem dolazi do akumulacije biomase mikroorganizama i proizvodnje organske tvari koja se dalje također koristi u svrhu rasta i opskrbe energijom (Medeiros i sur., 2017). Svi navedeni nutrijenti su važni za razvoj mikroba, njihovu raznolikost i međusobne interakcije u staništu.

Mnogi geni povezani s metabolizmom dušika i sumpora kodiraju važne termostabilne enzime ključne u mnogim katalitičkim reakcijama (Sahay i sur., 2017). Prisutnost mikroorganizama poput SOB potvrdila je transformaciju spojeva sumpora u geotermalnim vodama Hrvatske (Slika 17, Prilog 3). Oksidacija i redukcija sumpora dva su glavna procesa uključena u metabolizam sumpora, a jedna od važnih transformacija u samom metabolizmu je i stvaranje sumporovodika (H_2S) zbog sinteze brojnih aminokiselina koje sadrže sumpor. Također, kemolitotrofi koji oksidiraju sumpor mogu koristiti H_2S kao donor elektrona (Dalcin Martins i sur., 2022). Predstavnici poput *Sulfuricurvum*, *Sulfurovum*, *Thiofaba*, *Acinetobacter* i *Rhodococcus* pronađeni u uzorcima pripadaju bakterijama koje oksidiraju sumporovodik, a koje se mogu koristiti prilikom uklanjanja sumpora tijekom procesa pročišćavanja otpadnih voda (Jian Luo i sur., 2011; Mir i sur., 2021). Iako je uočena jasna podjela i oblikovanje mikrobne zajednice geotermalnih voda po dominaciji raznih spojeva elemenata sumpora ili dušika, neki od navedenih SOB rodova

pronađeni su i na lokalitetima u kojima prevladavaju nitrati što ukazuje da bi se oksidacija sumpora mogla postići u anoksičnim uvjetima uz redukciju NO_3^- . Pronađeni predstavnici koljena Desulfobacterota obuhvaćaju i sulfat-reducirajuće bakterije (SRB) što dodatno sugerira na kompleksni unutarnji ciklus sumpora (engl. *internal sulfur cycle*) u ovim geotermalnim vodama (Jackson i sur., 1999; Liu i sur., 1999).

Prisutnost predstavnika AOA i NOB, kao i „comammox“ organizama (Slika 17, Prilog 3) ukazuje na njihovu ključnu ulogu u procesima nitrifikacije unutar biogeokemijskog ciklusa dušika u geotermalnim vodama Hrvatske. Ova metabolička raznolikost nitrifikatora prisutnih u uzorcima geotermalne vode uključuje dvije raznolike skupine mikroorganizama ključne za odvijanje nitrifikacije u dva koraka, kao i „comammox“ nitrifikatore koji su sposobni za odvijanje potpune nitrifikacije uz smanjenje emisije N_2O (Daims i sur., 2015; Cordero i sur., 2016; Stein i Klotz, 2016; Daims i Wagner, 2018; Abby i sur., 2020; Maddela i sur., 2022). Pronađene termofilne AOA poput *Candidatus Nitrosotenuis* i *Candidatus Nitrososphaera* ključne su u biogeokemijskom ciklusu dušika zbog odvijanja prvog koraka procesa klasične nitrifikacije (Hatzenpichler i sur., 2008; Stein i Klotz, 2016). U većini ekosustava utvrđeno je da su AOA brojčano zastupljenije od AOB, kao što je i ovdje slučaj (Prilog 3). Brojni predstavnici AOA poznati su po korištenju u postrojenjima za pročišćivanje otpadnih voda prilikom bioloških procesa uklanjanja $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (Li i sur., 2016). Također, osim što su vrlo značajne za proces nitrifikacije, vrste roda *Nitrospira* (NOB, comammox) pronađene u istraživanim geotermalnim vodama Hrvatske, značajne su i za samu bioremedijaciju (Lebedeva i sur., 2005; Stein i Klotz, 2016; Maddela i sur., 2022).

Prisutnost predstavnika Planctomycetes na nekim lokalitetima može ukazivati na to da bi anaerobna oksidacija NH_3 mogla biti još jedan metabolički put koji podržava primarnu produkciju u uvjetima niske koncentracije O_2 , budući da su koncentracije otopljenog O_2 na istraživanim lokacijama uglavnom bile ispod 1 mg/L (Ghilamical i sur., 2017).

Trenutno pretpostavljene funkcije pronađenih mikrobnih svojti mogle bi se detaljnije istražiti i utvrditi proučavanjem njihovih transkriptoma, kao i metodama koje se temelje na uzgoju, stvarajući čiste kulture i proučavajući fiziologiju mikrobnih vrsta od interesa.

5.1.5. Analiza rezultata matematičkih modela uzročnosti

Matematički modeli uzročnosti su iznimno složeni modeli koji mogu pridonijeti razumijevanju interakcija i utjecaja fizikalno-kemijskih parametara na oblikovanje strukture

mikrobnih zajednica u raznim ekosustavima (Runge, 2023). Geotermalni izvori i bušotine su sustavi s velikim brojem varijabli od kojih su mnoge nepoznate ili nisu mjerene, a interakcije abiotičkih i biotičkih varijabli su često nelinearne. Sukladno tome, razdiobe gustoće vjerojatnosti obično nisu normalno raspodjeljene niti dobro poznate. Iako geotermalna staništa nisu jako dinamična kao drugi vodeni ekosustavi, i dalje se primjećuju promjene fizikalno-kemijskih parametara i sastava mikrobne zajednice zbog utjecaja brojnih kemijskih i biokemijskih reakcija unutar ovog ekstremnog staništa, a ponekad i zbog vanjskih čimbenika poput meteorske vode i antropogenog utjecaja. Abiotički i biotički čimbenici su u međusobnoj interakciji čije su zakonitosti samo djelomično poznate, i trenutno prema tome samo djelomično i objašnjive (Kurtanjek, 2022).

Nakon tri sezone uzorkovanja i prikupljanja podataka o mikrobnoj zajednici prokariota te fizikalno-kemijskim parametrima na 19 različitih lokaliteta, matematički model uzročnosti potvrdio je važnost parametara temperature, pH i nutrijenata za pojavu prokariota vezanih za cikluse dušika i sumpora u geotermalnim vodama Hrvatske te isto tako uputio na dihotomiju tih mikrobnih zajednica te njihove moguće međusobne interakcije (Slika 18, Slika 19, Prilog 3) (Guo i sur., 2020; Huang i sur., 2021; Lagostina i sur., 2021). Ujedno, ovaj model identificirao je povezanost parametara poput T, O₂ i pH, zatim EC, DIC, DOC, HCO₃⁻, Na⁺ i Cl⁻ te NH₄⁺, NO₃⁻ i TN (Slika 18). Također, nakon tri sezone prikupljanja podataka ukazano je i na važnost koncentracije O₂ i otopljenog organskog ugljika (DOC) za pojedine AOA predstavnike unutar porodica Nitrosopumilaceae (F5), Nitrososphaeraceae (F6) i Nitrosotaleaceae (F7) te NOB/comammox predstavnike iz porodice Nitrospiraceae (F11). Uz to, ukazao je i na nužnost prisutnosti DOC prilikom razvoja mikroorganizama vezanih za ciklus S. U procesima uzgoja ovih mikroorganizama poput AOA, NOB, comammox te SOB i SRB, uvjeti poput temperature, pH, koncentracije nutrijenata (C, N, S) i O₂ skupa s biotičkim interakcijama, moraju se prilagoditi kako bi se postigao željeni rezultat uzgoja mikroorganizama od interesa vezanih za ciklus N i S (Park i sur., 2010; Lebedeva i sur., 2013; Ismail i sur., 2014; Daims i sur., 2015; Spieck i sur., 2020). Dodatnim kauzalnim analizama mogu se identificirati pozitivni ili negativni učinci određenih faktora na ciljane mikroorganizme (Slika 19), što smanjuje potrebu za eksperimentalnim ispitivanjima različite kombinacije uvjeta te rezultira uštedom vremena, resursa i napora. Na taj način, kauzalni model može pružiti smjernice za prilagodbu uvjeta i postizanje optimalne ravnoteže između učinkovitosti i ekonomičnosti.

Međutim, od svih parametara najviše se uočava povezanost analiziranih porodica, odnosno njihove međusobne interakcije (F5 – F6 – F7 – F11; F1 – F2 – F8 – F9 – F10; F3 – F4) koje opet prvenstveno ukazuju na dihotomiju dušikovih i sumpornih spojeva te pripadajućih porodica, kao i na međusobno poticanje na suživot ili kompeticiju, ovisno o vrstama (Slika 18, Slika 19) (Park i sur., 2010). Stoga, kroz modeliranje interakcija između različitih varijabli, zaista bi se moglo predvidjeti kako će se određene promjene uvjeta odraziti na koncentraciju specifičnih spojeva ili metabolita te prisutnost određenih vrsta.

Uspoređujući rezultate dobivene drugim statističkim analizama u prvoj fazi istraživanja i pregledavajući relevantnu literaturu o geotermalnim vodama diljem svijeta, ovi modeli uzročnosti, preko podataka iz 3 sezone uzorkovanja, smisljeno su ukazali na utjecaj međusobnih interakcija i fizikalno-kemijskih parametara na oblikovanje strukture mikrobne zajednice prokariota u geotermalnim vodama Hrvatske. Međutim, za pravilniju primjenu ovakvih modela uzročnosti u praksi mikrobne ekologije, kao što je smanjenje eksperimentalnog napora pri kultivaciji, potrebno je stvaranje veće baze podataka u smislu sezonskog analiziranja podataka geotermalnih voda, a za varijabilnije sustave poput drugih slatkih i morskih voda u smislu svakodnevnog analiziranja fizikalno-kemijskih parametara i sastava zajednice od interesa (Kurtanjek, 2022; Runge, 2023). Važno je napomenuti da se ovakvi modeli temelje na matematičkim pretpostavkama i statističkim analizama te da ih zasad svakako treba nadopuniti eksperimentalnim potvrdama (Spirtes, 2010). Unatoč tome, mogu biti koristan alat za usmjeravanje daljnjih istraživanja i olakšavanje procesa optimizacije u biotehnologiji (Rezić i sur., 2021; Arif i MacNeil, 2022).

5.2. Druga faza istraživanja

5.2.1. Problematika istraživanja mikrobne zajednice eukariota

Proučavanjem relativne i stvarne zastupljenosti mikrobnih eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske, prvenstveno se uočava nedostatak informacija u bazama podataka potrebne pri dodjeli taksonomije, a time i pri donošenju pravilnih zaključaka o strukturi zajednice te mogućem utjecaju okolišnih parametara na oblikovanje mikrobne zajednice eukariota. Prije same obrade, većina podataka dobivenih sekvenciranjem, već i pri najvišoj taksonomskoj kategoriji (supergrupa) te pri dodatnom filtriranju i uklanjanju Metazoa, nije mogla biti uključena u daljnju obradu zbog nedostatka informacija o pripadajućoj taksonomiji. Tako mali set podataka, istraživanjem sve nižih taksonomskih kategorija, dodatno se sužavao radi informacija koje nedostaju za pravilnu

identifikaciju pronađenih vrsta, što ukazuje na glavni problem prilikom proučavanja raznolikosti mikrobne zajednice eukariota. Stoga, većina zaključaka vezanih za mikrobne eukariote može biti donešena na razini porodice, a rijetko na razini roda i/ili vrste, što u konačnici itekako može dovesti do pogrešne procjene. Iz priloženog se vidi da se filtriranjem na razini roda izgubio veliki dio podataka za daljnju obradu radi nemogućnosti dodjele pripadajuće taksonomije, kao i svrstavanja u pravilne taksonomske kategorije ili taksone (Slika 23, Slika 24, Slika 25, Slika 26, Prilog 5, Prilog 6). Ovo nije slučaj vezan samo za mikrobne eukariote u geotermalnim vodama, već za mikrobne eukariote općenito u različitim tipovima staništa jer im se pridodaje puno manje pažnje za razliku od naveliko istraživanih prokariotskih zajednica (Oliverio i sur., 2018).

Također, ono što se pokazalo neophodnim za potrebe daljnjeg istraživanja raznolikosti mikrobnih eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske je korištenje početnica specifičnih za identifikaciju skupina od interesa. Korištene univerzalne početnice za identifikaciju zajednice mikrobnih eukariota pokrivaju cjelokupnu raznolikost eukariota i dosta su nespecifične za potrebe istraživanja eukariota na mikrobnj razini. Tijekom ovog istraživanja, većina identificirane eukariotske zajednice u geotermalnim vodama Hrvatske taksonomski je svrstana u proizvoljnu kategoriju Metazoa (Slika 24) koja bi se za pravilnu interpretaciju podataka trebala ukloniti jer se radi o vrstama koje pripadaju mnogostaničnim životinjama, a ne mikroorganizmima (Habdija i sur., 2011).

5.2.2. Struktura eukariotske mikrobne zajednice

Na 14 uzorkovanih geotermalnih lokaliteta u Hrvatskoj identificiran je sastav zajednice eukariota tijekom jeseni 2020. godine. Razina raznolikosti prikazana na Slici 23. i Slici 24. bila je očekivana, budući da su prethodna istraživanja mikrobnih eukariota u geotermalnim vodama u svijetu ukazala na relativno mali broj predstavnika protista (Brown i Wolfe, 2006). S druge strane, Oliverio i suradnici (2018) utvrdili su puno veću taksonomsku i filogenetsku raznolikost protista u geotermalnim vodama Novog Zelanda.

Relativna zastupljenost mikrobnih eukariota imala je strukturu dosad tipičnu za geotermalne vode na najvišoj taksonomskoj razini (Aguilera i sur., 2010; Aguilera, 2013; Oliverio i sur., 2018). Mikrobnj eukarioti, baš kao i prokarioti, imaju različite funkcionalne uloge u svakom ekosustavu. Stoga, značajan dio mikrobne zajednice eukariota činili su fotoautotrofi/miksotrofi (predstavnici Chlorophyta, Ochrophyta (*Tribonema*, *Navicula*, *Cymbella*, *Chromulina*),

Streptophyta (*Spirogyra*), Cryptophyta (*Cryptomonas*), neki predstavnici Dinoflagellata) (Slika 25, Prilog 5). Ove mikroalge skupa sa bakterijskim primarnim proizvođačima (nekim predstavnicima Cyanobacteria i Chloroflexi) odgovorne su za sintezu ugljikohidrata potrebnih za razvoj drugog dijela zajednice mikrobnih eukariota poput drugih miksotrofa/heterotrofa (Ciliophora, Pseudofungi te komenzali Lobosa i Conosa) koji metaboliziraju sintetizirane ugljikohidrate unutar vodenog staništa (Debroas i sur., 2017). U otvorenim geotermalnim izvorima poput TOP, TUH, JEZ i SJA gdje je dostupnost sunčevih zraka velika, pronađeni su predstavnici Chlorophyta i Cryptophyta. Na istim mjestima uzorkovanja, kao i na lokalitetu KRE, pronađeni su i zeleni biofilmovi tijekom tri sezone uzorkovanja čije su konzorcije činili predstavnici prokariota poput Cyanobacteria i Chloroflexi, i to vrlo vjerojatno u kombinaciji s fotosintetskim mikroalgama pronađenim u geotermalnoj vodi na navedenim lokalitetima (Kostešić i sur., 2023). Odnos između određenih skupina primarnih proizvođača preko pozitivnih i negativnih korelacija, upućuje na suživot određenih skupina na istom prostoru te na međusobnu kompeticiju za nutrijente i stanište (Slika 29). Osim toga, cijeli ovaj ciklus upućuje na to da su uz prokariote, i mikrobni eukarioti povezani s perturbacijom organske tvari te da čine bitan dio mikrobne petlje, pa time i dio baze hranidbene mreže.

Neki pronađeni predstavnici poput roda *Spumella* (Chrysophyceae) (Slika 25) izgubili su mogućnost odvijanja procesa fotosinteze, iako imaju vrlo bliske fotosintetske srodnike (Kim i sur., 2020). Unatoč značajnoj ulozi u prijenosu ugljika u mikrobnoj petlji, kao i evolucijskim promjenama u načinu ishrane od fototrofije do heterotrofije, pridaje im se relativno malo pažnje (Jeong i sur., 2021).

Utvrđene male koncentracije otopljene organske tvari na većini lokaliteta ukazuju na prisutnost razlagača. Manja zastupljenost predstavnika Fungi i Sagenista (Slika 24), kao i njihova međusobna negativna korelacija (Slika 30), može ukazivati na razgradnju raspoložive organske tvari preko drugih heterotrofa poput bakterija, koji su konkurentniji i učestaliji u vodenim ekosustavima (Wurzbacher i sur., 2010), a zasad i u ekstremnom staništu kao što su geotermalne vode jer su trenutno istraživanja raznolikosti protista ograničena na nekoliko geotermalnih izvora u svijetu (Brown i Wolfe, 2006; Aguilera i sur., 2010; Oliverio i sur., 2018; Pumas i sur., 2018; Brown i Fritz, 2019). Pronađeni termofilni eukariotski predstavnici poput različitih vrsta roda *Candida* (Prilog 6), kao i prokariotski predstavnici, razvili su brojne strategije za mogućnost

preživljavanja u uvjetima visoke temperature zbog čega imaju golemu primjenu u industriji, poljoprivredi i zdravstvu (Singh i sur., 2019).

Osim primarnih proizvođača i razlagača, utvrđene su mikrobne eukariotske skupine često patogenog/parazitskog načina života poput predstavnika Apicomplexa i Mesomycetozoa (Slika 24) (Mendoza i sur., 2002; Morrison, 2009; Cavalier-Smith, 2014). Isto tako, ovo upućuje na činjenicu kako su mikrobne populacije prokariota i eukariota različitog načina života međusobno isprepletene u mreži interakcija unutar kompleksne mikrobne petlje.

Prostorna varijacija mikrobnih eukariota u ispitivanim geotermalnim vodama Hrvatske drugačija je nego prilikom istraživanja prokariotske zajednice (Slika 27). Budućim sezonskim ispitivanjem mogli bi se odrediti mogući okolišni uvjeti koji utječu na prostornu varijaciju između istraživanih lokaliteta, kao i na moguće promjene u strukturi mikrobne eukariotske zajednice na istom lokalitetu. Osim toga, dodatno bi se mogao istražiti odnos primarnih proizvođača/miksotrofa i heterotrofa/razlagača proučavanjem cirkulacije organske tvari. Trenutni rezultati zasigurno čine temelj daljnjeg ispitivanja sezonskih promjena istraživanih zajednica i mogućih okolišnih pokretača tih promjena u cjelokupnoj strukturi mikrobne zajednice eukariota geotermalnih voda u Hrvatskoj.

5.2.3. Utjecaj abiotičkih čimbenika na sastav mikrobnih eukariota i mogući biotehnološki potencijal identificiranih eukariotskih mikroalgi

S obzirom na raspon izmjerenih temperatura, kao i na dokazani utjecaj temperature na oblikovanje zajednice (Slika 28), moglo bi se zaključiti da su identificirani mikrobni eukarioti u geotermalnim vodama Hrvatske mezofilni do termotolerantni organizmi s optimalnim rastom između 36 – 46 °C zbog najveće utvrđene raznolikosti na lokalitetima TOP, SVM i D1D (Slika 20, Slika 22, Slika 24, Prilog 4). Najveća izmjerena temperatura (64,8 °C) bila je u BIZ sa samo jednom identificiranom porodicom mikrobnih eukariota (Dinophyceae) za razliku od istraživanja Oliveria i suradnika (2018) gdje je veća raznolikost protista bila povezana s višom temperaturom. Uočeno je da je niža temperatura pogodovala razvoju Sagenista (Slika 24, Slika 30).

Dokazano je da pri povišenoj temperaturi, mikroalge razvijaju termostabilne enzime i veći sadržaj GC parova baza (gvanin-citozin) od mezofilnih algi, što zasigurno može samo olakšati prirodno pročišćavanje otpadnih voda i uklanjanje organskog ugljika, fosfora i dušika (Saini i sur., 2021). Osim toga, neke mikroalge identificirane u geotermalnim vodama Hrvatske radi drugih

poznatih karakteristika poput visoke brzine rasta, učinkovite fiksacije CO₂ te smanjenja emisije stakleničkih plinova imaju prednosti pri korištenju u brojnim biotehnološkim procesima kao što je bioremedijacija (Darvehei i sur., 2018; Goswani i sur., 2021).

Isto tako, neutralna do blago lužnata vrijednost pH odigrala je značajnu ulogu ($p < 0,05$) prilikom formiranja strukture mikrobne zajednice eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske (Slika 20, Slika 28). Primjerice, KRE je bio lokalitet s najviše izmjerenom pH vrijednosti (8,3) (Slika 20) te s najmanjom utvrđenom raznolikosti vrsta (Slika 24, Prilog 4). Iako, ova pH vrijednost nije ekstremna kao u istraživanju Oliveria i suradnika (2018) već upućuje na blago lužnato stanište, i ovdje je uočeno smanjenje raznolikosti i distribucije protista, čak i sa samo blagim povećanjem pH vrijednosti, kao u geotermalnim vodama Novog Zelanda (Oliverio i sur., 2018).

Najveća koncentracija kisika povezana je s lokalitetom SJA koji je prema tome očekivano imao i najnižu izmjerenu temperaturu. Međutim, brojnost i raznolikost vrsta protista (Slika 24, Prilog 4) nisu se povećale s obzirom na moguće povoljnije uvjete života. Unatoč prisutnosti prokariotskih i neki eukariotskih primarnih proizvođača, postoje lokaliteti na kojima je utvrđena anoksija tijekom jeseni 2020. (JEZ, KRA, STU, TUH, VAR i SVM) što može upućivati na moguće odvijanje procesa anaerobne respiracije unutar staništa i prisutnost (fakultativnih) anaeroba ili kemotsintetskih mikroba koji mogu koristiti i oksidirane oblike sumpora i dušika za dobivanje energije (Oren, 2009).

Razvoj eukariotskih primarnih proizvođača u geotermalnim vodama Hrvatske varira i ovisi o mjestu uzorkovanja, a često se njihova prisutnost može povezati s nutrijentima poput ugljika i dušika te s prisutnošću svjetla, kao i u svakom vodenom staništu (Goswani i sur., 2021). Najviše predstavnika Dinoflagellata (39,5 %) utvrđeno na području BIZ može biti povezano s visokim koncentracijama analiziranih dušikovih spojeva, posebice nitrata (Dagenais-Bellefeuille i Morse, 2013). Slična situacija uočena je i na ostalim lokalitetima te iako se radi o miksotrofnoj skupini mikroorganizama, nitrati zasigurno imaju ulogu pri pojavi određenih predstavnika Dinoflagellata. Najviše koncentracije dušikovih spojeva utvrđene su na lokalitetu SVM gdje je potvrđen i statistički značajan utjecaj nitrata na mikrobnu zajednicu ($p < 0,05$, Slika 28) te gdje su pronađeni i neki od ostalih predstavnika primarnih proizvođača/miksotrofa (Chlorophyta, Ochrophyta (*Cymbella*, *Chromulina*) i Streptophyta) kojima su za primarni i sekundarni metabolizam, osim najvažnijeg nutrijenta ugljika, također važne i koncentracije raznih dušikovih spojeva (Prilog 5) (Goswani i sur., 2021). S druge strane, uočena je i negativna korelacija Ochrophyta i nitrata,

povezana s razvojem nekih drugih predstavnika navedene skupine poput *Navicula*, *Tribonema* i *Chromulina* i to na lokaciji s puno nižom koncentracijom dušikovih spojeva ukazujući na mogućnost da je njihov razvoj doveo do smanjenja koncentracije nutrijenata (Slika 20, Slika 25, Slika 29).

Vrste roda *Spirogyra*, neke vrste roda *Cryptomonas*, kao i dijatomeje poput pronađenih predstavnika rodova *Navicula* i *Cymbella* (Slika 25) imaju bitan ekološki značaj zbog uklanjanja CO₂ iz atmosfere procesom fotosinteze. Procjena je da 20 – 30 % O₂ na Zemlji proizvode upravo dijatomeje koje su dosad našle brojne primjene kao što je proizvodnja biogoriva, sekundarnih metabolita ili učestala primjena u prehrambenoj industriji (Bramhanwade i sur., 2023). Općenito, pronađeni predstavnici dijatomeja (*Cymbella* i *Navicula*) česti su rodovi obraštajnih zajednica u slatkovodnim ekosustavima, a zbog svoje osjetljivosti i vrlo brzog odgovora na biološke i fizikalno-kemijske promjene u vodi često služe kao biološki indikatori. Osim toga, ovi autotrofni predstavnici sa silicificiranom ljušturicom imaju vrlo važnu ulogu u fiksaciji ugljika (Seckbach i Gordon, 2019).

Kao i identificirani prokariotski mikroorganizmi, mikrobnii eukarioti poput vrsta roda *Tribonema* (Slika 25) mogu se koristiti u bioremedijacijskim procesima uklanjajući nitrate i fosfate u otpadnim vodama (Cheng i sur., 2019; Wang i sur., 2019). Osim prokariotskih predstavnika cijanobakterija, pronađeni predstavnici eukariotskih primarnih proizvođača/miksotrofa koriste nitrate i fosfate kao nutrijente, odnosno kao hranjive tvari što dovodi do povećane biomase mikroalgi pa u optimiziranim i kontroliranim uvjetima njihov potencijal zasigurno nije upitan (Goswani i sur., 2021).

Isto tako, neke vrste roda *Chromulina* (Chrysophyceae) i *Tribonema* (Xanthophyceae) (Slika 25) koriste se u proizvodnji biogoriva/biodizela kao alternativno rješenje proizvodnje goriva iz fosilnih izvora (Bux, 2013; Mohler Mitman, 2019). Ovo saznanje ne predstavlja pretjerano novu informaciju, no zbog trenutne inflacije, fluktuacija cijena nafte i uvijek aktualnog globalnog zatopljenja, za buduća istraživanja bazirana na proučavanju geotermalnih voda Hrvatske ovo predstavlja izazov na biotehnoškoj i društveno-političkoj razini, ali i moguće rješenje.

Iako temperatura ne predstavlja problem prilikom njihovog uzgoja već ukazuje na moguću prednost, drugi mogući problemi za masovno korištenje mikroalgi u biotehnoške svrhe jesu mala gustoća njihovih kultura, kao i mikroskopska građa zbog čega je potrebno uzgajati i koristiti velike volumene kultura mikroalgi. Osim toga, sami otežani uvjeti uzgoja različitih vrsta mikroalgi u

otvorenim i/ili zatvorenim bioreaktorima, također mogu predstavljati problem pri korištenju i komercijalnoj proizvodnji, što nikako ne umanjuje činjenicu da termofilne mikroalge zaista predstavljaju veliki potencijal i moguću prekretnicu vezanu za zaštitu okoliša i očuvanje kvalitete voda uz održavanje društveno-ekonomske koristi cijele zemlje, pogotovo u ovo doba globalnog zatopljenja.

5.3. Treća faza istraživanja

5.3.1. Uzgoj kultura

5.3.1.1. Stabilnost fizikalno-kemijskih parametara

Tijekom uzorkovanja u rujnu 2020. na lokalitetima AVD, KRE i STU te u listopadu 2021. na lokalitetu AVD, kao i tijekom prethodne tri sezone uzorkovanja (jesen 2019., proljeće 2020., jesen 2020.) rezultati fizikalnih parametara ukazali su na stabilnost glavnih faktora kao što su temperatura i pH vrijednost (Slika 31, Tablica 12). Budući da su ovi lokaliteti potpuno zatvoreni i zaštićeni od vanjskih i antropogenih utjecaja te su također dobro zaštićeni balneološki lokaliteti (AVD i STU), bilo je očekivano da će varijabilnost ovih glavnih parametara biti vrlo mala. Kao što je već napomenuto, slična stabilnost se opaža i u drugim geotermalnim vodama diljem svijeta, gdje nema gubitka topline uslijed miješanja geotermalne vode s meteorskom vodom i drugim sličnim utjecajima (Meziti i sur., 2021).

Stabilnost i upravljanje parametrima kao što su pH vrijednost i temperatura te njihovo sustavno praćenje i održavanje, predstavlja temelj uspješne kultivacije mikroorganizama od interesa iz određenog staništa. Navedene vrijednosti predstavljaju optimalne uvjete za rast i aktivnost specifične termofilne mikrobne zajednice. Stabilnost ovih parametara u procesima kultivacije je ključna jer njihove fluktuacije ili odstupanja od utvrđenih optimalnih vrijednosti mogu znatno narušiti vitalnost, metabolizam te utjecati na sposobnost razmnožavanja mikroorganizama od interesa.

5.3.1.2. Analiza sastava mikrobne zajednice prokariota u uzgojenim kulturama

Struktura mikrobne zajednice prokariota u kulturama pokazala je izrazitu varijabilnost u odnosu na uzorkovanu vodu korištenu za nasadivanje kultura (Slika 32, Prilog 7). Dodatno, otkriveno je da se zajednica značajno razlikuje ovisno o vrsti medija i dodanog supstrata, dok su

samo različita razrijeđenja istog uzorka pokazivala sličniju strukturu zajednice s manjim fluktuacijama. Ovakav promjenjivi uzorak rezultat je očekivane interakcije između sastava medija i supstrata, koji su prilagođeni podržavanju rasta određenih skupina organizama od interesa. Pravilan odabir ovih komponenti predstavlja ključne aspekte u procesima kultivacije, koji mogu značajno utjecati na sastav i dinamiku mikrobne zajednice.

Očekivano, primjena antibiotika kanamicina u uzorcima je rezultirala smanjenom raznolikošću i brojnošću vrsta, no ipak nije doprinijela selekciji mikroorganizama od interesa (Slika 32, Prilog 7). Drugim riječima, ovaj postupak je imao opći učinak na selekciju mikroorganizama, ali nije pridonio specifičnom odabiru željenih nitrifikanata. S druge strane, cilj razrjeđivanja uzoraka je bio smanjenje broja vrsta i selekcija mikroorganizama od interesa te povećanje njihove biomase. Međutim, rezultati su varirali i nisu uvijek bili uspješni.

Nakon eksperimenata provedenih s ciljem uzgoja mikroorganizama povezanih s ciklusom dušika, najčešći rodovi koji koriste dušikove spojeve, a koji su se pojavljivali u većini uzoraka bili su *Meiothermus* i *Nitrospira*, što ukazuje na sporu, ali donekle uspješnu selekciju mikroorganizama od interesa (Slika 33, Slika 34, Slika 35). Za rod *Meiothermus* dokazano je da sudjeluje u ciklusu dušika, a najčešće pronađeni predstavnik bio je *M. silvanus*, kod kojeg su u genomu pronađeni specifični geni za denitrifikaciju (Sikorski i sur., 2010). *NirK* gen vezan uz proces denitrifikacije karakterističan je i za vrstu *M. chliarophilus* koja se ponekad razvila u kulturama (Raposo i sur., 2019). Vrste roda *Thermus* jesu termofilne bakterije od velikog biotehnološkog interesa jer predstavljaju izvor termostabilnih enzima. U kulturama je pronađena vrsta *T. thermopilus* koja reducira nitrat i nitrit do N_2O u procesu nepotpune denitrifikacije ili do N_2 u procesu potpune denitrifikacije (Schurig-Briccio i sur., 2013). Također, prisutnost roda *Denitratisoma* u nekim uzorcima (Slika 33B, Slika 34B, Slika 35B) sugerira na prisutnost bakterija koje vrše denitrifikaciju. Uz vrste roda *Meiothermus* i *Thermus*, ovo dodatno potvrđuje mogućnost konverzije dušikovih spojeva putem procesa nitrifikacija-denitrifikacija u uzorcima kultura (Yang i sur., 2023).

Predstavnici roda *Nitrospira* uglavnom su bile bakterije koje oksidiraju nitrit (NOB), a ponekad su se pojavljivali i potpuni oksidanti amonijaka (comammox organizmi), kao što je *Ca. N. inopinata*, iako u vrlo malom postotku (Pjevac i sur., 2017; Daims i Wagner, 2018). Međutim, bilo je i uzoraka koji su pokazali određenu zastupljenost termofilnih AOA (*Candidatus Nitrososphaera* i *Candidatus Nitrosotenuis*) (Slika 33, Slika 34, Slika 35). Ovo ukazuje na bolji

odabir uvjeta rasta u nekim kulturama, uključujući medij i dodatak određenog supstrata, koji su podržali rast ovih nitrificirajućih mikroorganizama (Daims i sur., 2015; Daims i Wagner, 2018; Abby i sur., 2020).

Unatoč pažljivom odabiru medija i supstrata vezanih za uzgoj nitrificirajućih mikroorganizama, promjene u dominaciji mikrobne zajednice u nekim uzorcima nisu se znatno usmjerile prema željenim vrstama. Umjesto toga, primijetilo se da su se često mikrobne zajednice sastojale od termotolerantnih organizama iz koljena Proteobacteria, kao što su *Methyloversatilis* sp. i *Silanimonas* sp. (Lee i sur., 2005; Doronina i sur., 2014). Iako je temperatura za uzgoj mikroorganizama iznosila 46 °C, česti predstavnici u kulturama bili su iz koljena Deinococcota (*Thermus*, *Meiothermus* i *Deinococcus*), Proteobacteria (*Caldimonas hydrothermale*), te Firmicutes (*Bacillus*) i Actinobacteria (*Thermoleophilum*), koji se uglavnom smatraju termofilima ili hipertermofilima (> 60 °C) (Urbieta i sur., 2014; Saxena i sur., 2017; Power i sur., 2018; Najar i sur., 2022). Drugim riječima, unatoč definiranim i uskim uvjetima uzgoja koji su se dosad pokazali povoljnim za slatkovodne nitrifikante, primijećeno je da su dominantni predstavnici mikrobne zajednice, koji su se pojavljivali i tijekom tri sezone uzorkovanja, kao i u vodi korištenoj za nasađivanje kultura, i dalje često prisutni u uzgojenim kulturama.

5.3.1.3. Rasprostranjenost funkcionalnih gena uključenih u ciklus dušika u vodi i uzgojenim kulturama

Analizom funkcionalnih gena vezanih uz ciklus dušika uočena je prisutnost ključnih gena povezanih s procesom nitrifikacije, kako u izvornoj geotermalnoj vodi (AVD, STU i KRE), tako i u pojedinim uzorcima kultura, iako u kulturama u znatno nižoj koncentraciji. Jedan od najvažnijih enzima u reakciji nitrifikacije je amonij monooksigenaza, koja predstavlja poveznicu između potpunih nitrifikanata (comammox organizama) i AOA/AOB, unatoč njihovoj različitoj strukturi (Pjevac i sur., 2017). Gen *amoA*, povezan s AOA, uočen je na više lokaliteta u većim koncentracijama u usporedbi s genom comammox A *amoA*, a posebno u usporedbi s genom comammox B *amoA* (Slika 36). Isto tako, na mjestima gdje je uočena prisutnost *amoA* gena (AOA), često su prisutni i geni koji kodiraju nitrit oksidoreduktazu (*nxrA/B*) čija koncentracija na nekim lokalitetima ukazuje na češću pojavu odvijanja procesa nitrifikacije u dva koraka, za razliku od odvijanja procesa potpune nitrifikacije (Slika 36). S druge strane, na lokalitetima poput STU i AVD, osim AOA *amoA* i *nxrB*, comammox organizmi koji posjeduju enzime amonij

monooksigenazu (AMO) i hidroksilamin dehidrogenazu (HAO) prisutni su u značajnoj koncentraciji, ukazujući na često odvijanje procesa potpune nitrifikacije te moguću kompeticiju za supstrat (Daims i sur., 2015). Gen *amoA* povezan s AOA pronađen je samo u nekim uzorcima kultura, gdje je sekvenciranjem potvrđena prisutnost svojti *Candidatus Nitrosotenuis* i *Candidatus Nitrososphaera*, a comammox A *amoA* povezan je s pojavom vrste *Ca. Nitrospira inopinata* (Slika 34, Slika 35, Slika 36) (Daims i sur., 2015; Pjevac i sur., 2017).

NXR je ključni enzim u procesu nitrifikacije, pri čemu podjedinica *nxrA* sadržava supstratne vezne centre, dok podjedinica *nxrB* usmjerava elektrone iz NO_2^- u respiratorni lanac (Lucker i sur., 2010; Pester i sur., 2014). Ove podjedinice, s naglaskom na *nxrB*, istraživane u uzorcima kultura, predstavljaju korisne funkcionalne i filogenetske markere za predstavnike roda *Nitrospira* koji su odgovorni za oksidaciju nitrita (NOB) (Pester i sur., 2014). Rezultati analize gena *nxrA* i *nxrB* uglavnom se podudaraju s filogenetskim rezultatima dobivenim na temelju analize 16S rRNA, a obje podjedinice *nxr* gena su pronađene u 9 uzoraka geotermalnih voda u Hrvatskoj. To ukazuje na mogućnost česte oksidacije nitrita u nitrat putem aktivnosti NOB. *Nxr* geni pronađeni su u uzorcima gdje je sekvenciranjem potvrđena prisutnost roda *Nitrospira* (Slika 33, Slika 34, Slika 35, Slika 36) (Pester i sur., 2014).

5.3.1.4. Optimalni uvjeti razvoja nitrificirajućih mikroorganizama

Analiza mikrobne zajednice u uzgojenim kulturama geotermalnih voda upućuje na važnost odabira odgovarajućeg medija i supstrata, s obzirom na njihovu sposobnost da podrže rast specifičnih mikroorganizama. Razumijevanje utjecaja različitog medija, supstrata, pa i lokaliteta može pružiti važan uvid u ekološke interakcije unutar mikrobne zajednice te pomoći u optimizaciji uvjeta uzgoja mikroorganizama u laboratorijskim uvjetima.

Rezultati su ukazali na specifične preferencije mikroorganizama vezanih za ciklus dušika na pojedinim lokalitetima te na njihovu selektivnost prema određenim medijima i koncentracijama supstrata. AOA su se najbolje razvili u izvornoj vodi te u OHIO mediju koji je već dugi niz godina uspješno korišten u procedurama kultivacije AOA (Slika 38 A) (Bollmann i sur., 2011). Očekivano, AOB su se razvili najviše na AOM mediju pri koncentraciji od 25 mM NH_4Cl (Lebedeva i sur., 2013) (Slika 38 B), koja se ipak pokazala vrlo visokom za razvoj AOA te im je odgovarala niža koncentracija od 10 mM NH_4Cl (Slika 38 A). Općenito, u praksi početna koncentracija od 10 mM

bilo kojeg supstrata inače se smatra najoptimalnijom, a veće koncentracije poput one od 25 mM često se smatraju toksičnim koncentracijama.

S druge strane, početna koncentracija od 29 mM NaNO₂ pokazala se optimalnom za razvoj nitrit-oksidirajućih bakterija i to na istoimenom NOB mediju (Spieck i sur., 2020). Koncentracija 0,29 mM NaNO₂ očito je bila vrlo niska za razvoj NOB jer je primijećen njihov postepeni rast u uzorcima koja je sadržavala supstrate s najmanjom do najveće koncentracije NaNO₂ (Slika 39).

Comammox organizmi su se uspjeli donekle razviti na sve četiri vrste medija ukazujući na velike mogućnosti prilagodbe na koncentracije različitih supstrata te sastav različitih medija (Slika 40), iako su se najbolje razvili na OHIO mediju s dodatkom 10 mM NH₄Cl.

Promatrajući sastav mikrobne zajednice različitih kultura po pojedinim lokalitetima, mikroorganizmi vezani za ciklus dušika uzgojeni u kulturama lokaliteta STU, ukazali su na moguću prilagodbu različitim uvjetima medija i supstrata preko pozitivnog uzgoja NOB (*Nitrospira*), ali s većim naglaskom na denitrifikante (*M. silvanus*) upućujući na odvijanje dviju najbitnijih reakcija unutar ciklusa dušika, kao i na mikroorganizme s mogućim biotehnološkim potencijalom u bioremedijaciji (Slika 45). S druge strane, mikroorganizmi identificirani u kulturama lokaliteta KRE vrlo su selektivni i osjetljivi na promjene uvjeta jer NOB predstavnici nisu uspjeli opstati u testiranim laboratorijskim uvjetima, za razliku od comammox organizma *Ca. Nitrospira inopinata* kojoj su AOM medij u kombinaciji s 25 mM NH₄Cl bili najpogodniji uvjeti za razvoj. Isto tako, ovaj lokalitet predstavlja pogodno stanište za daljnje proučavanje comammox organizama u geotermalnoj vodi s velikim biotehnološkim potencijalom u bioremedijaciji (Slika 44) (Daims i sur., 2015). Ono što razlikuje kulture lokaliteta AVD od STU i KRE je razvoj *Ca. Nitrososphaera* i *Ca. Nitrosotenuis*, poznatih predstavnika AOA sa širokom biotehnološkom primjenom. Osim nitrificirajućih organizama, kao što su navedeni AOA te *Ca. N. inopinata* i NOB *Nitrospira*, u pojedinim kulturama došlo je do razvoja rodova karakterističnih i za procese denitrifikacije (*Meiothermus*, *Denitratisoma*) također upućujući na mogućnosti konverzije dušikovih spojeva stvorenih u kulturama pri različitim uvjetima uzgoja (Slika 42, Slika 43) (Yang i sur., 2023).

Dobiveni rezultati na tri lokaliteta pri istim uvjetima uzgoja ukazuju na selektivnost i osjetljivost mikroorganizama na promjene okolišnih uvjeta, ali i na široku genetičku raznolikost mikroorganizama geotermalnih voda Hrvatske s naglaskom na veliki potencijal u pročišćivanju otpadnih voda. Ujedno, ovi rezultati predstavljaju temelj daljnjeg uzgoja nitrificirajućih i denitrificirajućih mikroorganizama u njima optimalnim uvjetima. Sama voda ovih izdvojenih

geotermalnih lokaliteta obiluje nitrifikantima te bi se već kao takva mogla iskorištavati u biotehnologiji. S druge strane, u daljnjem nastavku procedure kultivacije u trenutnim uvjetima, STU lokalitet mogao bi pružiti veći izvor NOB i denitrifikanata, KRE izvor comammox organizama, a AVD izvor AOA uz druge nitrifikante i denitrifikante čije bi čiste kulture pomogle u proučavanju fiziologije termofilnih nitrifikanata i denitrifikanata, a u praksi i poboljšanim procesima bioremedijacije (Koch i sur., 2018, Maddela i sur., 2022).

Dosad uzgojene kulture ukazuju na kompleksnu interakciju između analiziranih nitrificirajućih mikroorganizama, medija i supstrata prilikom formiranja mikrobne zajednice u kulturama geotermalnih voda, pružajući dublje razumijevanje ciklusa dušika u optimiziranim uvjetima. Ono što bi svakako dalo kvalitetniju sliku stanja kultura i mogućeg funkcionalnog kapaciteta uzgojene zajednice je proučavanje njihovih metagenoma, pogotovo s obzirom na to da se dosta podataka o nitrifikantima izgubilo na razini vrste/roda sekvenciranjem 16S rRNA gena (Slika 33, Slika 34, Slika 35), kao što je slučaj vezan za porodicu Nitrosomonadaceae koja sadrži poznate AOB, a koji su qPCR analizom također detektirani (Slika 38).

5.3.2. Biološka obrada procjedne vode biootpada

Za biootpad je karakterističan visoki sadržaj vlage koji minimalno mora iznositi 50 % za olakšano odvijanje mikrobne aktivnosti (Liang i sur., 2003), a u ovom pokusu iznosio je preko 60 %. Optimalni početni sadržaj vlage prema Yeh i sur. (2020) iznosi 55 – 70 % te ukoliko navedeni raspon nije osiguran, aktivnost mikroorganizama se smanjuje, tj. minimalna je. S druge strane, ako je početni sadržaj vlage veći od optimalnog raspona, dolazi do stvaranja anaerobnih uvjeta jer voda ispunjava pore i prostor između komponenti biootpada te smjesa postaje zbijenija (Morris i sur., 2018; Yeh i sur., 2020).

Procjednim vodama smatra se svaka tekućina koja prolazi kroz otpad (koja je u njemu sadržana ili u njemu nastaje) te su takve vode često visoko opterećene. Odlaganjem biootpada nastaju značajne količine procjednih voda koje zbog složenosti sustava zahtijevaju posebne tretmane obrade poput bioloških postupaka obrade (Divya i sur., 2015). Na visoko opterećenje u ovoj procjednoj vodi ukazivale su visoke vrijednosti KPK na početku pokusa (11492 mg/L).

Za uspješno odvijanje ekonomičnijeg procesa bioremedijacije, neophodno je održavanje temperature (20 - 35 °C) u šaržnom sustavu, odnosno prirodnih uvjeta i procesa koji se održavaju neprekidnim miješanjem (biostimulacija). Praćenje bioloških svojstava kao što je sastav mikrobne

zajednice te fizikalno-kemijskih čimbenika poput pH vrijednosti, kemijske potrošnje kisika (KPK), TSS, koncentracije otopljenog kisika i hranjivih tvari ukazuju na kvalitetu odvijanja samog procesa razgradnje organske tvari (Metcalf i Eddy, 2003).

Postupak kompostiranja pri čemu nastaje i procjedna voda, proces je prirodne razgradnje, a može se ubrzati miješanjem organskog otpada s dodatnim sastojcima poput novih (egzogenih) mikroorganizama u postojeću (autohtonu, prirodno prisutnu) mikrobnu zajednicu s ciljem optimizacije mikrobiološkog rasta (bioaugmentacija) (Periša, 2019). U posljednje vrijeme, pažnja je usmjerena na proučavanje mikrobnih zajednica geotermalnih voda diljem svijeta s obzirom na sve veću ulogu termofilnih mikroorganizama u biotehnološkim procesima poput bioremedijacije (Metcalf i Eddy, 2003; Cai i sur., 2020).

5.3.2.1. Sastav procjedne vode u provedenim pokusima

Biootpad iz kojeg je izdvojena procjedna voda (eluat) pripadao je zelenom otpadu koji se sastoji od dvorišnog otpada (lišće, granje) i ostataka hrane (Krogmann i Woyczehowski, 2000; Tyrrel i sur., 2008). Sukladno tome, takve procjedne vode sadržavaju visoku koncentraciju hranjivih tvari poput dušikovih i fosfornih spojeva (Romero i sur., 2013). U ovom pokusu koji je simulirao ekonomski prihvatljiv biotehnološki proces bioremedijacije u prirodnim uvjetima s autohtonom zajednicom (Pokus 1) te u prirodnim uvjetima s autohtonom zajednicom i egzogenim kulturama (Pokus 2 i 3), procjedna voda je karakterizirana ponajviše visokim koncentracijama fosfata, koji vjerojatno potječe od razgradnje lako biorazgradivog organskog otpada poput zelenog otpada. Ova koncentracija fosfata postupno se smanjivala tijekom dana uzorkovanja, posebno u Pokusu 3 ukazujući na najveću razgradnju (Tablica 16, Tablica 17, Tablica 18). Utvrđene vrijednosti nitrata tijekom pokusa upućuju na odsutnost toksičnih koncentracija za rast mikroorganizama što je izravno povezano s učinkovitošću kemijske ili biokemijske potrošnje kisika (NN 26/2020). Osim toga, ukoliko bi došlo do ispuštanja ove procjedne vode u prihvatne vode, zbog utvrđene smanjene koncentracije hranjivih tvari, stanje prirodne vode ne bi bilo u opasnosti u smislu eutrofikacije. Međutim, za precizniju procjenu stanja ove otpadne procjedne vode, bilo bi potrebno mjeriti koncentracije ukupnog fosfora (TP) i ukupnog dušika (TN).

S druge strane, unatoč značajnom smanjenju vrijednosti KPK, procjedna voda u sva tri pokusa i dalje je imala visoke koncentracije KPK u odnosu na dozvoljene vrijednosti prema Pravilniku o graničnim vrijednostima opasnih i drugih tvari u otpadnim vodama. Prema tim

propisima, vrijednost KPK za industrijske otpadne vode iznosi 700 mg O₂/L, dok za komunalne otpadne vode iznosi 125 mg O₂/L (NN 26/2020). Ipak, po rezultatima KPK za kontrolni Pokus 1 vidljivo je da se u prva četiri dana razgradilo čak 68 %, u Pokusu 2 65 % i u Pokusu 3 70 % organske tvari. Zadnjeg 10. dana mjerenja KPK, zbog uočenog očekivanog usporavanja i stagniranja procesa razgradnje, zabilježeno je da se ukupno u Pokusu 1 razgradilo 88 %, u Pokusu 2 90 %, a u Pokusu 3 92 % organske tvari. Drugim riječima, ove vrijednosti predstavljaju smanjenje ukupnog organskog opterećenja za 88 % u sustavu s autohtonim, prirodno prisutnim mikroorganizmima, dok je u sustavu gdje se uz autohtone mikroorganizme nalaze i egzogeni mikroorganizmi došlo do smanjenja ukupnog organskog opterećenja za 90 %, odnosno 92 %.

Osim vrijednosti KPK, niske vrijednosti koncentracije otopljenog kisika ukazuju na najveću brzinu razgradnje organske tvari, odnosno na povećanu aktivnost mikroorganizama tijekom odvijanja eksperimenta, posebno u 2., 3. i 4. danu (Tablica 16, Tablica 17, Tablica 18). Nakon tog razdoblja, vrijednosti otopljenog kisika se povećavaju i u konačnici stagniraju, što upućuje na zaostajanje metaboličkih produkata te usporavanje procesa razgradnje. Sukladno tome, početno povećanje i smanjivanje biomase tijekom vremena u sva tri pokusa se opaža kroz rezultate fluorescentne mikroskopije te kroz promatranje zabilježenih vrijednosti OG i TSS koje su najviše tijekom dana s najvećom razgradnjom, a nešto niže pred kraj pokusa. Osim što pad vrijednosti OG upućuje na odumiranje biomase i početak stagniranja procesa razgradnje, promjena vrijednosti OG veže se s promjenom vrijednosti KPK i upućuje na činjenicu kako veća prisutnost mikroorganizama zahtijeva i troši više kisika prilikom aerobne razgradnje prisutne onečišćene organske tvari (Šabić-Runjavec i sur., 2015).

Tijekom sva tri pokusa, optimalna vrijednost pH postupno je porasla od 5,5 do blago lužnatog područja (8,4) (Tablica 16, Tablica 17, Tablica 18). To je u skladu s očekivanjima za takve procese. Važno je napomenuti da vrijednost pH od 9,0 predstavlja graničnu vrijednost u pravilnicima vezanim uz otpadne vode (NN 26/2020). Povećanje koncentracije sulfata često je povezano s povećanjem pH vrijednosti, odnosno s kiselim uvjetima koji olakšavaju otpuštanje sulfatnih iona u procjednu vodu. Osim toga, tijekom pokusa, može se primijetiti smanjenje vrijednosti EC kroz vrijeme koja se kreće postupno povećavati nakon što je utvrđena smanjena razgradnja, odnosno usporavanje procesa. To može biti povezano s različitim procesima obrade budući da fizikalni, kemijski ili biološki procesi mogu utjecati na koncentraciju iona što rezultira

smanjenjem vrijednosti konduktiviteta. Pri kraju koncentracija iona vjerojatno ponovno raste što dovodi do povećanja vrijednosti EC.

Također, mijenjanje mirisa eluata u svim pokusima, pokazatelj je napredovanja procesa razgradnje organske tvari te time i postupnog razvijanja plinova sa sve intenzivnijim mirisom karakterističnim za biootpad. Boja eluata u svim pokusima s vremenom poprimala je sve tamniju nijansu što su potvrdile povećane spektrofotometrijske vrijednosti, a sama boja u konačnici predstavlja otopljene tvari, odnosno sadržaj anorganskih i organskih komponenti (Morris i sur., 2018).

5.3.2.2. Analiza strukture mikrobnih zajednica prokariota i eukariota tijekom biološke obrade procjednih voda biootpada

Uzimajući u obzir prednosti termofila, kao i dokumentirani sastav prokariotske i eukariotske zajednice tijekom nekoliko sezona uzorkovanja (Slika 10, Slika 24), identificirani predstavnici prokariotskih i eukariotskih zajednica ukazuju na mogućnost učinkovitog metaboliziranja organske tvari čime bi značajno mogli doprinijeti poboljšanju procesa bioremedijacije. Navedene činjenice potvrđuju rezultati smanjenja ukupnog organskog opterećenja preko 90 % u pokusima s bioaugmentacijom.

Tijekom pokusa razgradnje primijećena je dominantnost bakterija (Slika 46), među kojima su neke već prepoznate zbog svoje sposobnosti fermentacije, razgradnje različitih organskih spojeva ili se općenito često nalaze u otpadnim vodama, poput vrsta roda *Leuconostoc*, *Weissella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Sphingobium* i *Sphingobacterium* (Prilog 13) (Wang i sur., 2012; Andreevskaya i sur., 2016; Jabari i sur., 2016; Vuković Domanovac i sur., 2019a; Vuković Domanovac i sur., 2019b; Kučić Grgić i sur., 2019; Kavitate i sur., 2020). Ovakav tip bakterija često posjeduje enzime poput amilaza, lipaza i proteaza koji olakšavaju razgradnju tvari, pridonoseći tako prirodnom ciklusu razgradnje organske tvari. Termofilni nitrificirajući mikroorganizmi uzgajani u kulturama, nisu bili uočeni u eksperimentalnom sustavu.

S kombinacijom bakterija, gljiva i praživotinja (Protozoa) stvara se aerobni suspendirani sustav poznat kao aktivni mulj. Protozoe djeluju kao predatori bakterija i zahtijevaju prisutnost kisika kako bi dobile energiju metaboliziranjem tvari sadržanih u bakterijama. Nedostatak Protozoa u ovakvim sustavima ukazuje na moguću toksičnost otpada, no takav scenarij nije primijećen u

ovom eksperimentu zbog identifikacije *Colpoda*, *Flamella* i *Glissomonadida* (Slika 47) (Wang, 2012). Nastanak aktivnog mulja ukazuje na uspješnost razgradnje organske tvari.

Unatoč općenitoj manjoj raznolikosti mikrobnih eukariota u usporedbi s prokariotskim mikroorganizmima u sva tri pokusa, jasno je da su gljive (Ascomycota), kao prirodni razlagači, najdominantnije u ranim fazama sva tri pokusa te postupno dolazi do njihove kompeticije s bakterijama (Sánchez i sur., 2017; Yang i sur., 2022). Osim toga, niže vrijednosti pH pogoduju razvoju gljiva, što ih čini najzastupljenijim mikrobnim eukariotima prva četiri dana uzorkovanja (Slika 47) (Sánchez i sur., 2017, Šabić i sur., 2019). Kako pH vrijednost raste i prelazi u blago lužnato područje, brojnost gljiva, poput *Pichia* i *Hanseniaspora*, opada u sva tri pokusa, posebno u kontrolnom Pokusu 1, dok se povećava zastupljenost *Candida* i *Galactomyces* koje bolje uspijevaju u takvim uvjetima staništa (Prilog 15) (Vylkova i sur., 2011; Guo i sur., 2019). Naravno, vrsta i brojnost predstavnika gljiva uvelike ovise o supstratu koji se kompostira. U slučaju supstrata bogatim celulozom i ligninom, kao što je slučaj u ovom eksperimentu, gljive imaju vrlo važnu ulogu u procesima razgradnje (Banić, 2017). Vrste roda *Pichia* često posjeduju enzime poput celulaza, proteaza i lipaza važni za procese razgradnje, posebno kada se radi o biljnom otpadu, kao što je ovdje slučaj (Lata i sur., 2022). Osim toga, neke vrste sudjeluju i u procesima fermentacije i sintezi metabolita koji dodatno pridonose razgradnji organske tvari (Peña i sur., 2018, De i sur., 2021).

Ipak, trenutni rezultati u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada ukazuju na nepotpunu aktivnost termofilnih mikroorganizama koji bi potencijalno još više ubrzali procese razgradnje. Zaključeno je da se u pokusima većinom odvijao prirodni proces razgradnje procjedne vode biootpada te da bioaugmentacija ima ograničeni utjecaj na poboljšanje ukupne učinkovitosti procesa. Razlog tomu je nedostatak optimalnih uvjeta za razvoj termofila, odnosno nedovoljna biostimulacija s naglaskom na temperaturu koja bi potaknula njihovu prirodnu biološku aktivnost i ubrzala učinkovitost i razgradnju organskog otpada. Budući da su pokusi održavani u šaržnim sustavima s temperaturom od $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, što inače predstavlja optimalnu temperaturu za odvijanje biotehnoloških procesa, ova temperatura pogoduje razvoju mezofilnih mikroorganizama, kako se i vidi iz priloženih rezultata. Osim toga, iako su egzogene kulture sadržavale i vrste rodova inače karakterističnih u procesima razgradnje procjedne vode poput *Bacillus*, *Klebsiella*, *Psuedomonas* i *Aeromonas*, postupci kultiviranja mikroorganizama pod strogo određenim uvjetima zbog pokušaja izolacije specifičnih prokariotskih predstavnika od interesa (Slika 32), zasigurno su

ograničili optimalne životne uvjete većine prokariotskih termofila pronađenih u geotermalnim vodama Hrvatske. To je sigurno dodatno utjecalo na ukupno smanjenje bioraznolikosti unutar provedenih eksperimenata i njihov potencijalni doprinos te doveo do slabijih rezultata od očekivanih.

Međutim, uočeno je ipak nešto veće smanjenje vrijednosti KPK u Pokusu 3 (s egzogenom kulturom AVD) u usporedbi s kontrolom (Tablica 18). Jedan od mogućih razloga za nešto učinkovitiju razgradnju u pokusu s egzogenom kulturom može biti prisutnost sinergijskih interakcija između mikroorganizama gdje zajedničko djelovanje mikroorganizama dovodi do pojačane bioremedijacije. S druge strane, moguće su i antagonističke interakcije mikroorganizama u ostalim pokusima, gdje određeni rodovi mikroorganizama mogu inhibirati rast i aktivnost drugih. Osim dominacije vrsta karakterističnih za razgradnju procjedne vode poput *Sphingobacterium* (14,4 %) i *Chryseobacterium* (21,2 %) u Pokusu 3 za razliku od druga dva pokusa, moguće je da je njihova sinergija s ostalim svojstama u Pokusu 3 bila jača, što je rezultiralo poboljšanom razgradnjom i smanjenjem KPK vrijednosti. Također, brojnost i raznolikost svojiti u Pokusu 3 kontinuirano su rasle i bile nešto veće nego u kontrolnom Pokusu 1 (Prilog 12, Prilog 14), što je moglo pridonijeti razgradnji i nižim vrijednostima KPK, čak i uz njihovu malu prisutnost. Stoga, iako aktivnost termofila nije u potpunosti utvrđena, moguće je da je egzogena kultura kao dodana komponenta ipak pridonijela razgradnji procjedne vode biootpada putem sinergijskih učinaka te poticanjem rasta i aktivnosti drugih vrsta mikroorganizama, posebno u Pokusu 3.

Daljnja istraživanja primjene termofilnih mikroorganizama, bilo uzgojenih kultura tijekom višegodišnjeg razdoblja (možda i uzgoj drugih mikroorganizama od interesa) ili izravno korištenje geotermalnih voda Hrvatske, nužna su kako bi se u potpunosti razumio potencijal termofilnih mikroorganizama u području biotehnoške primjene. Ova istraživanja predstavljaju temelj za proučavanje primjene termofila u biotehnologiji i mogu rezultirati napretkom u području upravljanja otpadnim vodama procesom bioremedijacije u kombinaciji s bioaugmentacijom i biostimulacijom te donijeti pozitivne ekološke i društvene učinke.

6. ZAKLJUČCI

Geotermalne vode u Hrvatskoj predstavljaju slabo istraženo stanište mikroorganizama s neiskorištenim i raznolikim potencijalom. Ova disertacija predstavlja prvo istraživanje koje pruža uvid u sastav mikrobnih zajednica prokariota i eukariota najpoznatijih geotermalnih voda u Hrvatskoj, a koje se trenutno uglavnom koriste u balneološke svrhe. U sklopu disertacije, tijekom tri faze istraživanja geotermalnih voda u Hrvatskoj utvrđeni su sljedeći zaključci:

Prva faza istraživanja:

1. Koristeći visoko-protočnu metodu sekvenciranja amplikona 16S rRNA gena, otkriveno je da su najzastupljeniji predstavnici bakterija u većini geotermalnih voda povezani s koljenima Proteobacteria i Campylobacterota, dok najdominantniji predstavnici arheja pripadaju koljenu Crenarchaeota. Na razini roda, zajednica prokariota bila je vrlo specifična za mjesto uzorkovanja s čestom dominacijom jednog roda poput *Hydrogenophilus*, *Sulfuricurvum*, *Sulfurovum*, *Thiofaba* ili *Nitrospira*, dok su najdominantniji rodovi arheja bili povezani s predstavnicima AOA poput *Candidatus Nitrosotenuis* i *Candidatus Nitrososphaera*.
2. Parametri poput temperature, pH vrijednosti, NO_3^- , NH_4^+ , TN, SO_4^{2-} i H_2S , kao i DOC te DIC, bili su abiotički čimbenici koji su značajno utjecali na oblikovanje strukture zajednice prokariota, dok sezonska varijabilnost nije uočena.
3. S obzirom na dihotomiju između zajednica geotermalnih voda u kojima dominiraju mikroorganizmi koji oksidiraju ili reduciraju dušikove (AOA, AOB, NOB, comammox) i sumporne spojeve (SOB, SRB) te činjenicu da geni povezani s metabolizmima dušika i sumpora kodiraju važne termostabilne enzime ključne u mnogim biokemijskim reakcijama, mikroorganizmi iz geotermalnih voda u Hrvatskoj mogli bi proizvesti širok raspon enzima bakterija i arheja za različitu upotrebu u brojnim biotehnološkim procesima. Mikroorganizmi iz Daruvarskih toplica (AVD, IVD, D1D) poput predstavnika AOA, AOB, NOB i comammox mogu se koristiti u bioremedijaciji dušikovih spojeva, a SOB te SRB s drugih geotermalnih lokaliteta poput BOS, TUH, VAR i KRA u bioremedijaciji spojeva sumpora.
4. Pomoću modela uzročnosti bilo je moguće identificirati i potvrditi ključne varijable i njihove interakcije, koje (i na koji način) najviše utječu na promjene u ekosustavu i na strukturu mikrobnе zajednice prokariota, poput: I) temperature, pH vrijednosti, električne vodljivosti, koncentracije otopljenog O_2 i nutrijenata te II) međusobne interakcije analiziranih porodica koje mogu poticati na suživot ili kompeticiju u ovom ekstremnom staništu.

5. Strukturno uzročni model dobiven u ovoj disertaciji na temelju podataka prikupljenih tijekom tri sezone uzorkovanja može se koristiti za pojednostavljenje odabira uvjeta uzgoja mikrobnih vrsta od interesa, kao što su mikroorganizmi s izraženim biotehnoškim potencijalom u procesu bioremedijacije, čime se pridonosi mogućem smanjenju eksperimentalnog napora u budućim pokušajima kultivacije. Dugoročnije praćenje sustava detaljnije bi moglo otkriti kauzalne interakcije abiotičkih i biotičkih čimbenika od interesa u znanstvenoj disciplini kao što je mikroba ekologija.

Druga faza istraživanja:

1. Koristeći visoko-protočnu metodu sekvenciranja amplikona 18S rRNA gena, utvrđena je struktura mikrobnih eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske, koja je bila tipična kao u proučavanim geotermalnim vodama diljem svijeta, odnosno sastavljena od primarnih proizvođača, miksotrofa, razlagača, heterotrofa te parazita. Mikrobnih eukariota skupa s prokariotima međusobno su isprepleteni u mreži interakcija unutar kompleksne mikrobne petlje.
2. Mikroba zajednica eukariota bila je specifična za mjesto uzorkovanja te nije ovisila o vrsti vodonosnika ili tipu geotermalnog lokaliteta (bušotina/izvor).
3. Temperatura i pH vrijednost uz nitrata vodeći su parametri oblikovanja strukture zajednice mikrobnih eukariota ($p < 0,05$) na 5 izdvojenih lokaliteta (JEZ, STU, TOP, SVM, D1D) na kojima je utvrđen najveći kvantitativni i kvalitativni sastav identificiranih mikrobnih eukariota od ukupno 14 istraživanih geotermalnih lokaliteta.
4. Moguće korištenje mikrobnih eukariota u biotehnoške svrhe bazirano na trenutnom istraživanju geotermalnih voda u Hrvatskoj tijekom jeseni 2020. godine preko konteksta sa postojećom literaturom veže se za bioremedijaciju voda (*Tribonema*), proizvodnju biogoriva/biodizela (*Tribonema*, *Chromulina*) i njihovu primjenu kao bioloških indikatora (*Cymbella*, *Navicula*) te ukazuje na bitan ekološki značaj mikroalgi posebice na lokalitetima JEZ, TOP, SVM i D1D.
5. Istraživanje mikrobnih eukariota u geotermalnim vodama Hrvatske kroz samo jednu sezonu podcjenjuje njihovu sezonalnu raznolikost i važnost u ovom ekstremnom tipu staništa. Trenutni rezultati čine temelj daljnjeg ispitivanja sezonskih promjena zajednica i mogućih okolišnih pokretača tih promjena u cjelokupnoj strukturi mikrobne zajednice eukariota te naglašavaju da

geotermalne vode u Hrvatskoj kriju ne samo prokariote, već i eukariote s iznimnim potencijalom u biotehnologiji.

Treća faza istraživanja:

Uzgoj kultura

1. Struktura mikrobne zajednice prokariota u kulturama pokazala je izrazitu varijabilnost u odnosu na sastav zajednice početnog dana uzorkovanja, vrstu medija i koncentraciju dodanog supstrata, što ukazuje na važnost pravilnog odabira ovih komponenti u procesima kultivacije, uz sustavno praćenje i upravljanje parametrima kao što su temperatura i pH vrijednost.
2. Unatoč pažljivom odabiru medija i supstrata, promjene u dominaciji mikrobne zajednice u nekim uzorcima često se nisu znatno usmjerile prema željenim vrstama, što ukazuje na potrebu za boljim odabirom uvjeta uzgoja te sporu selekciju i prilagodbu mikroorganizama od interesa.
3. Prisutnost umjereno termofilnih nitrifikacijskih mikroorganizama, kao što su AOA (*Candidatus Nitrososphaera* i *Candidatus Nitrosotenuis*) i *Nitrospira* (NOB, comammox) te vrsta rodova *Meiothermus* i *Denitratisoma* u uzorcima kultura sugerira na mogućnost konverzije dušikovih spojeva putem procesa nitrifikacija-denitrifikacija.
4. Utvrđeno je da su za rast određenih mikroorganizama vezanih za ciklus dušika najpovoljniji sljedeći uvjeti: AOA - izvorna voda i OHIO medij s dodatkom supstrata 10 mM NH₄Cl; AOB - AOM medij s dodatkom supstrata 25 mM NH₄Cl; NOB - NOB medij s dodatkom supstrata 29 mM NaNO₂, comammox - OHIO medij s dodatkom supstrata 10 mM NH₄Cl.
5. Rezultati uzgoja sugeriraju na čestu koegzistenciju AOA/AOB i NOB u kulturama te na mogućnost odvijanja procesa nitrifikacije u dva koraka, ali i na odvijanje potpunog procesa nitrifikacije zbog uspješno uzgojene vrste *Candidatus Nitrospira inopinata*.

Biološka obrada procjedne vode biootpada

1. Ukupno organsko opterećenje u kontrolnom Pokusu 1 smanjilo se za 88 %, a u pokusima s dodatkom mješavina egzogenih kultura za 90 % (Pokus 2), odnosno za 92 % (Pokus 3).
2. Mikrobna zajednica procjednih voda biootpada tijekom biološke obrade sastojala se od rodova bakterija poput *Leuconostoc*, *Weissella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Sphingobium* i *Sphingobacterium*, dominantnih gljiva pri niskom pH (*Pichia* i *Hanseniopsis*) te Protozoa *Colpoda*, *Flamella* i *Glissomonadida* koji ukazuju na netoksičnost otpada.

3. Rezultati ukazuju na vrlo visoku učinkovitost procesa razgradnje u šaržnom reaktoru u sva tri pokusa, kao i na to da se bioaugmentacijom s termofilnim mikroorganizmima uspješno doprinijeti poboljšanju procesa bioremedijacije pri temperaturi od 25 °C.

4. Smanjenje ukupnog organskog opterećenja bilo bi veće da su se koristili optimalniji uvjeti za rast termofila, a trenutni razlozi za pridonšenje poboljšanju procesa bioremedijacije dodatkom termofilnih egzogenih kultura mogu biti sinergijske/antagonističke interakcije između zajednica, veća dominacija vrsta karakterističnih za razgradnju procjednih voda poput *Sphingobacterium* (14,4 %) i *Chryseobacterium* (21,2 %) te veća brojnost i raznolikost svojti.

7. LITERATURA

1. Abby, S.S., Kerou, M., Schleper, C. (2020) Ancestral Reconstructions Decipher Major Adaptations of Ammonia-Oxidizing Archaea upon Radiation into Moderate Terrestrial and Marine Environments. *mBio*, 11(5). doi: 10.1128/mBio.02371-20
2. Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F. (2009) Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods*, 79(3), 321–328. doi: 10.1016/j.mimet.2009.09.026
3. Aguilera, A. (2013) Eukaryotic Organisms in Extreme Acidic Environments, the Río Tinto Case. *Life*, 3(3), 363–374. doi: 10.3390/life3030363
4. Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., González-Toril, E., Rendueles, O., Amils, R. (2010) Eukaryotic microbial diversity of phototrophic microbial mats in two Icelandic geothermal hot springs. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 13(1), 21–32. doi: 10.2436/20.1501.01.109
5. Albertsen, M., Karst, S.M., Ziegler, A.S., Kirkegaard, R.H., Nielsen, P.H. (2015) Back to Basics – The Influence of DNA Extraction and Primer Choice on Phylogenetic Analysis of Activated Sludge Communities. *PLOS ONE*, 10(7), p.e0132783. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0132783
6. Alves, R.J.E., Wanek, W., Zappe, A., Richter, A., Svenning, M.M., Schleper, C., Urich, T. (2013) Nitrification rates in Arctic soils are associated with functionally distinct populations of ammonia-oxidizing archaea. *The ISME Journal*, 7(8), 1620–1631. doi: doi.org/10.1038/ismej.2013.35
7. Aljinović, B., Blašković, I. (1984) Comparison of sediment basis and the Mohorovičić discontinuity in the coastal area of Yugoslavia. doi: 10.1111/j.1365-246X.2009.04288.x
8. Amaral-Zettler, L.A., McCliment, E.A., Ducklow, H.W., Huse, S.M. (2009) A Method for Studying Protistan Diversity Using Massively Parallel Sequencing of V9 Hypervariable Regions of Small-Subunit Ribosomal RNA Genes. *PLoS ONE*, 4(7), p.e6372. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0006372
9. Amin, A., Ahmed, I., Salam, N., Kim, B.-Y., Singh, D., Zhi, X.-Y., Xiao, M., Li, W.-J. (2017) Diversity and Distribution of Thermophilic Bacteria in Hot Springs of Pakistan. *Microbial Ecology*, 74(1), 116–127. doi: 10.1007/s00248-017-0930-1
10. Andreevskaya, M., Hultman, J., Johansson, P., Laine, P., Paulin, L., Auvinen, P., Björkroth, J. (2016) Complete genome sequence of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* KG16-1, isolated from vacuum-packaged vegetable sausages. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1). doi: doi.org/10.1186/s40793-016-0164-8
11. APHA (2012) *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 22nd Edition, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
12. Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., Weber, L. (2015) Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137. doi: doi.org/10.3354/ame01753
13. Arif, S., MacNeil, M.A. (2022) Applying the structural causal model (SCM) framework for observational causal inference in ecology. *Ecological Monographs*. doi: doi.org/10.1002/ecm.1554

14. Atalah, J., Cáceres-Moreno, P., Espina, G., Blamey, J.M. (2019) Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. *Bioresource Technology*, 280, 478–488. doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008
15. Aßhauer, K. P., Wemheuer, B., Daniel, R., Meinicke, P. (2015) Tax4Fun: predicting functional profiles from metagenomic 16S rRNA data. *Bioinformatics*, 31(17), 2882 - 2884. doi: 10.1093/bioinformatics/btv287
16. Baciú, D.C. (2023) Causal models, creativity, and diversity. *Humanities and Social Sciences Communications*, 10 (1), 1–15. doi: doi.org/10.1057/s41599-023-01540-1
17. Baker, B.J., Comolli, L.R., Dick, G.J., Hauser, L.J., Hyatt, D., Dill, B.D., Land, M.L., VerBerkmoes, N.C., Hettich, R.L., Banfield, J.F. (2010) Enigmatic, ultrasmall, uncultivated Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8806–8811. doi: 10.1073/pnas.0914470107
18. Bala, A., Singh, B. (2018) Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels. *Renewable Energy*, 136. doi: doi.org/10.1016/j.renene.2018.09.100
19. Banić, I. (2017) Obrada i zbrinjavanje mulja s uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. Završni rad. Pula.
20. Barnett, D., Arts, I., Penders, J. (2021) microViz: an R package for microbiome data visualization and statistics. *Journal of Open Source Software*, 6(63), p.3201. doi: 10.21105/joss.03201
21. Baumgartner, M., Yapi, A., Gröbner-Ferreira, R., Stetter, K.O. (2003) Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* nov. sp., an extremely thermophilic amoeba thriving in hot springs. *Extremophiles*. 7:267–74.
22. Bollmann, A., French, E., Laanbroek, H.J. (2011) Isolation, Cultivation, and Characterization of Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea Adapted to Low Ammonium Concentrations. *Research on Nitrification and Related Processes, Part A*, 55–88. doi: doi.org/10.1016/b978-0-12-381294-0.00003-1
23. Borović, S., Marković, I. (2015) Utilization and tourism valorisation of geothermal waters in Croatia. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 44, 52–63. doi: 10.1016/j.rser.2014.12.022
24. Bošnjak, R., Čubrić, S., Golub, M., Grabovski, K., Jelić, K., Kolin, I., Koščak, S., Kulenović, I., Miočev, D., Pravica, Z., Rajković, D., Salopek, B., Sečen, J., Stančić, L. (1998) GEOEN - Programme of geothermal energy utilization. *Hrvatske vode*, 6(25), 363–369.
25. Bowen De León, K., Gerlach, R., Peyton, B.M., Fields, M.W. (2013) Archaeal and bacterial communities in three alkaline hot springs in Heart Lake Geyser Basin, Yellowstone National Park. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00330
26. Bramhanwade, K., Narkhedkar, V., Dhyani S. (2023) Potential Industrial Application of Diatoms for a Greener Future. *Insights into the World of Diatoms: From Essentials to Applications*, 255–268. doi: doi.org/10.1007/978-981-19-5920-2_16

27. Briggs, B.R., Brodie, E.L., Tom, L.M., Dong, H., Jiang, H., Huang, Q., Wang, S., Hou, W., Wu, G., Huang, L., Hedlund, B.P., Zhang, C., Dijkstra, P., Hungate, B.A. (2013) Seasonal patterns in microbial communities inhabiting the hot springs of Tengchong, Yunnan Province, China. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1579–1591. doi: 10.1111/1462-2920.12311
28. Brock, T.D. (1964) *Life at High Temperatures*, published in booklet form by the Yellowstone Association for Natural Science, History & Education, Inc.
29. Brock, T.D. (1973) Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. *Science*. 179: 480–3.
30. Brock, T.D., Freeze (1969) *Thermus aquaticus* Brock & Freeze, 1969.
31. Brown, P.B., Wolfe, G.V. (2006) Protist Genetic Diversity in the Acidic Hydrothermal Environments of Lassen Volcanic National Park, USA. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(6), 420–431. doi: doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00125.x
32. Brown, S.R., Fritz, S.C. (2019) Eukaryotic organisms of continental hydrothermal systems. *Extremophiles*, 23(4), 367–376. doi: doi.org/10.1007/s00792-019-01101-y
33. Bushnell, B. (2014) *BBMap: A Fast, Accurate, Splice-Aware Aligner*. United States: N. p., sourceforge.net/projects/bbmap.
34. Bux, F. (2013) *Biotechnological Applications of Microalgae: Biodiesel and Value-Added Products*. CRC Press.
35. Cai, Y., Huang, Y., Huang, X., Fan, Z., Yu, T. (2020) Efficient biodegradation of organic matter using a thermophilic bacterium and development of a cost-effective culture medium for industrial use. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, [online] 55(6), 686–696. doi: doi.org/10.1080/10934529.2020.1732173
36. Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. (2016a) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
37. Callahan, B.J., Sankaran, K., Fukuyama, J.A., McMurdie, P.J., Holmes, S.P. (2016b) Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*, 5, p.1492. doi: 10.12688/f1000research.8986.2
38. Campbell, B.J., Engel, A.S., Porter, M.L., Takai, K. (2006) The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats. *Nature Reviews Microbiology*, 4(6), 458–468. doi: 10.1038/nrmicro1414
39. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J. (2010) QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335–336. doi: doi.org/10.1038/nmeth.f.303
40. Castelań-Sánchez, H.G., Lopéz-Rosas, I., García-Suastegui, W.A., Peralta, R., Dobson, A.D.W., Batista-García, R.A., Dávila-Ramos, S. (2019) Extremophile deep-sea viral communities

from hydrothermal vents: Structural and functional analysis. *Marine Genomics*, 46, 16–28. doi: 10.1016/j.margen.2019.03.001

41. Castelle, Cindy J., Wrighton, Kelly C., Thomas, Brian C., Hug, Laura A., Brown, Christopher T., Wilkins, Michael J., Frischkorn, Kyle R., Tringe, Susannah G., Singh, A., Markillie, L., Taylor, Ronald C., Williams, Kenneth H., Banfield, Jillian F. (2015) Genomic Expansion of Domain Archaea Highlights Roles for Organisms from New Phyla in Anaerobic Carbon Cycling. *Current Biology*, 25(6), 690–701. doi: 10.1016/j.cub.2015.01.014

42. Cavalier-Smith, T. (2014) Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. *European Journal of Protistology*, 50(5), 472–495. doi: doi.org/10.1016/j.ejop.2014.07.002

43. Çelik, I., Keskin, E. (2022) Revealing the Microbiome of Four Different Thermal Springs in Turkey with Environmental DNA Metabarcoding. *Biology*, 11(7), p.998. doi: doi.org/10.3390/biology11070998

44. Chauhan, A., Jindal, T. (2020) Biochemical and Molecular Methods for Bacterial Identification. *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*, 425–468. doi: doi.org/10.1007/978-3-030-52024-3_10

45. Cheng, P., Cheng, J.J., Cobb, K., Zhou, C., Zhou, N., Addy, M., Chen, P., Yan, X., Ruan, R. (2019) *Tribonema* sp. and *Chlorella zofingiensis* co-culture to treat swine wastewater diluted with fishery wastewater to facilitate harvest. *Bioresource Technology*, 297, p.122516. doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122516

46. Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M. (1976) Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of bacteriology*, 127(3), 1550–7.

47. Cole, J.K., Peacock, J.P., Dodsworth, J.A., Williams, A.J., Thompson, D.B., Dong, H., Wu, G., Hedlund, B.P. (2013) Sediment microbial communities in Great Boiling Spring are controlled by temperature and distinct from water communities. *The ISME Journal*, 7(4), 718–729. doi: 10.1038/ismej.2012.157

48. Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J.M. (2014) Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D633–D642. doi: doi.org/10.1093/nar/gkt1244

49. Colman, D.R., Amenabar, M.J., Fernandes-Martins, M.C., Boyd, E.S. (2022) Subsurface Archaea associated with rapid geobiological change in a model Yellowstone hot spring. *Communications Earth & Environment*, 3(1), pp.1–12. doi: doi.org/10.1038/s43247-022-00542-2

50. Cordero, O.X., Datta, M.S. (2016) Microbial interactions and community assembly at microscales. *Current Opinion in Microbiology*, 31, 227–234. doi: 10.1016/j.mib.2016.03.015

51. Crini, G., Lichtfouse, E. (2018) Wastewater treatment: An overview. *Environmental Chemistry for a Sustainable World*, 18, 1-9.

52. Dagenais-Bellefeuille, S., Morse, D. (2013) Putting the N in dinoflagellates. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2013.00369

53. Daims, H., Lebedeva, E., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M. (2015) Complete nitrification by *Nitrospira* bacteria. *Nature* 528, 504–509. doi: 10.1038/nature16461
54. Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (2001) In Situ Characterization of *Nitrospira*-Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5273–5284. doi: doi.org/10.1128/aem.67.11.5273-5284.2001
55. Daims, H., Wagner, M. (2018) *Nitrospira*. *Trends in Microbiology*, 26(5), 462–463. doi: 10.1016/j.tim.2018.02.001
56. Dalcin Martins, P., Echeveste Medrano, M.J., Arshad, A., Kurth, J.M., Ouboter, H.T., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., Welte, C.U. (2022) Unraveling Nitrogen, Sulfur, and Carbon Metabolic Pathways and Microbial Community Transcriptional Responses to Substrate Deprivation and Toxicity Stresses in a Bioreactor Mimicking Anoxic Brackish Coastal Sediment Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 13, p.798906. doi: 10.3389/fmicb.2022.798906
57. Danilova, I., Sharipova, M. (2020) The Practical Potential of Bacilli and Their Enzymes for Industrial Production. *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 1782. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782
58. Darvehei, P., Bahri, P.A., Moheimani, N.R. (2018) Model development for the growth of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 233–258. doi: doi.org/10.1016/j.rser.2018.08.027
59. De, S., Mattanovich, D., Ferrer, P., Gasser, B. (2021) Established tools and emerging trends for the production of recombinant proteins and metabolites in *Pichia pastoris*. *Essays in Biochemistry*, 65(2), 293–307. doi: doi.org/10.1042/EBC20200138
60. del Campo, J., Balagué, V., Forn, I., Lekunberri, I., Massana, R. (2013) Culturing Bias in Marine Heterotrophic Flagellates Analyzed Through Seawater Enrichment Incubations. *Microbial Ecology*, 66(3), 489–499. doi: doi.org/10.1007/s00248-013-0251-y
61. Didier Debroas, I.D., Humbert, J.-F., Ludwig, J., Cécile, L., Oudart, A., Najwa, T. (2017) Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 93(4). doi: doi.org/10.1093/femsec/fix023
62. Diemer, Elizabeth W., Hudson, James I., Javaras, Kristin N. (2021) More (Adjustment) Is Not Always Better: How Directed Acyclic Graphs Can Help Researchers Decide Which Covariates to Include in Models for the Causal Relationship between an Exposure and an Outcome in Observational Research. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 90(5), 289–298. doi: doi.org/10.1159/000517104
63. Dombrowski, N., Lee, J.-H., Williams, T.A., Offre, P., Spang, A. (2019) Genomic diversity, lifestyles and evolutionary origins of DPANN archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 366(2). doi: doi.org/10.1093/femsle/fnz008
64. Doronina, N.V., Kaparullina, E.N., Trotsenko, Y.A. (2014) *Methyloversatilis thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant facultative methylotroph isolated from a hot spring. *International*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 158–164. doi: doi.org/10.1099/ijs.0.055046-0

65. Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R. (2000) Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2943–2950.

66. Duraković, S. (1991) *Prehrambena mikrobiologija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Medicinska naklada.

67. Durham, B.P., Boysen, A.K., Carlson, L.T. (2019) Sulfonate-based networks between eukaryotic phytoplankton and heterotrophic bacteria in the surface ocean. *Nat. Microbiol.* 4, 1706–1715.

68. Edgar, R.C. (2013) UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 10(10), 996–998. doi: doi.org/10.1038/nmeth.2604

69. Eme, L., Doolittle, W. Ford (2015) Microbial Diversity: A Bonanza of Phyla. *Current Biology*, 25(6), R227–R230. doi: 10.1016/j.cub.2014.12.044

70. Energetski institut Hrvoje Požar (2017) *Geothermal Energy Utilisation Potential in Croatia, Field and Study Visits' Report*, 1 – 66.

71. Fecteau, K.M., Boyd, E.S., Lindsay, M.R., Amenabar, M.J., Robinson, K.J., Debes, R.V., Shock, E.L. (2021) Cyanobacteria and Algae Meet at the Limits of Their Habitat Ranges in Moderately Acidic Hot Springs. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 127(1). doi: 10.1029/2021JG006446

72. François, D.X., Godfroy, A., Mathien, C., Aubé, J., Cathalot, C., Lesongeur, F., L'Haridon, S., Philippon, X., Roussel, E.G. (2021) *Persephonella atlantica* sp. nov.: How to adapt to physico-chemical gradients in high temperature hydrothermal habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 44(1), p.126176. doi: 10.1016/j.syapm.2020.126176

73. Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer, J. (2001) Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria: Emergence of a Common Mechanism? *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2873–2882. doi: 10.1128/aem.67.7.2873-2882.2001

74. Frolov, E.N., Gololobova, A.V., Klyukina, A.A., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Pimenov, N.V., Chernyh, N.A., Merkel, A.Y. (2021) Diversity and Activity of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Kamchatka Hot Springs. *Microorganisms*, 9(10), p.2072. doi: doi.org/10.3390/microorganisms9102072

75. Fu, H., Uchimiya, M., Gore, J., Moran, M.A., (2020) Ecological drivers of bacterial community assembly in synthetic phycospheres. *PNAS* 7, 3656–3662.

76. Fuhrman, J.A., Hagström, Å. (2008) Bacterial and archaeal community structure and its patterns, *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell, New Jersey, 45 – 90.

77. Ge, S., Wang, S., Yang, X., Qiu, S., Li, B., Peng, Y. (2015) Detection of nitrifiers and evaluation of partial nitrification for wastewater treatment: A review. *Chemosphere*, 140, 85–98. doi: doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.004

78. Geisen, S., Laros, I., Vizcaíno, A., Bonkowski, M., de Groot, G.A. (2015) Not all are free-living: high-throughput DNA metabarcoding reveals a diverse community of protists parasitizing soil metazoan. *Mol Ecol.*, 24: 4556–69.
79. Ghilamical, A.M., Budambula, N.L.M., Anami, S.E., Mehari, T., Boga, H.I. (2017) Evaluation of prokaryotic diversity of five hot springs in Eritrea. *BMC Microbiology*, 17(1). doi: doi.org/10.1186/s12866-017-1113-4
80. Goodwin, M. Halvorsen, K. T., Jiao, L., Knausgard, K. M., Martin, A. H., Moyano, M., Oomen, R. A., Rasmussen, J. H., Sordalen, T. K., Thorbjornsen, S. H. (2022) Unlocking the potential of deep learning for marine ecology: overview, applications, and outlook. *ICES Journal of Marine Science*, 79, 2, 319-336. doi: doi.org/10.1093/icesjms/fsab255
81. Goswami, M., Chakraborty, P. Mukherjee, K., Mitra, G., Bhattacharyya, P., Dey, S., Tribedi, P. (2018) Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 6, 223-228.
82. Goswami, R.K., Agrawal, K., Verma, P. (2022) Multifaceted Role of Microalgae for Municipal Wastewater Treatment: A Futuristic Outlook toward Wastewater Management. *CLEAN – Soil, Air, Water*, p.2100286. doi: doi.org/10.1002/clen.202100286
83. Guillou, L., Bachar, D., Audic, S., Bass, D., Berney, C., Bittner, L., Boutte, C., Burgaud, G., de Vargas, C., Decelle, J., del Campo, J., Dolan, J.R., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Holzmann, M., Kooistra, W.H.C.F., Lara, E., Le Bescot, N., Logares, R. and Mahé, F. (2013) The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote Small Sub-Unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D597–D604. doi: doi.org/10.1093/nar/gks1160
84. Guo, G., Tian, F., Zhao, Y., Tang, M., Liu, W., Liu, C., Xue, S., Kong, W., Sun, Y., Wang, S. (2019) Aerobic decolorization and detoxification of Acid Scarlet GR by a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Galactomyces geotrichum* GG. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 145, p.104818. doi: doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104818
85. Guo, L., Wang, G., Sheng, Y., Sun, X., Shi, Z., Xu, Q., Mu, W. (2020) Temperature governs the distribution of hot spring microbial community in three hydrothermal fields, Eastern Tibetan Plateau Geothermal Belt, Western China. *Science of The Total Environment*, 720, p.137574. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137574
86. Guzović, Z., Rašković, P., Blatarić, Z. (2014) The comparison of a basic and a dual-pressure ORC (Organic Rankine Cycle): Geothermal Power Plant Velika Ciglena case study. *Energy*, 76(C), 175–186.
87. Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M. (2011) Protista-Protozoa i Metazoa-Invertebrata: Strukture i funkcije.
88. Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., Wagner, M. (2008) A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2134–2139. doi: 10.1073/pnas.0708857105

89. He, X-S., Xi, B-D., Zhang, Z-Y., Gao, R-T., Tan, W-B., Cui, D-Y., Yuan, Y. (2015) Composition, removal, redox and metal complexation properties of dissolved organic nitrogen in composting leachates. *Journal of Hazardous Materials* 283, 227-233.
90. Hitchcock, C. (2020) Causal Models. *Stanford Encyclopedia of Philosophy*, Summer edition.
91. Holmes, D.E., Dang, Y., Smith, J.A. (2019) Nitrogen cycling during wastewater treatment. *Advances in Applied Microbiology*, 113–192. doi: doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.10.003
92. Hong, Y., Jiao, L., Wu, J. (2020) New primers, taxonomic database and cut-off value for processing nxrB gene high-throughput sequencing data by MOTHUR. *Journal of Microbiological Methods*, p.105939. doi: doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105939
93. Hood-Nowotny, R., Umana, N.H.-N., Inselbacher, E., Oswald- Lachouani, P., Wanek, W. (2010) Alternative Methods for Measuring Inorganic, Organic, and Total Dissolved Nitrogen in Soil. *Soil Science Society of America Journal*, 74(3), 1018–1027. doi: doi.org/10.2136/sssaj2009.0389
94. Hou, L., Xie, X., Wan, X., Kao, S.-J., Jiao, N., Zhang, Y. (2018) Niche differentiation of ammonia and nitrite oxidizers along a salinity gradient from the Pearl River estuary to the South China Sea. *Biogeosciences*, 15(16), 5169–5187. doi: doi.org/10.5194/bg-15-5169-2018
95. Hou, W., Wang, S., Dong, H., Jiang, H., Briggs, B.R., Peacock, J.P., Huang, Q., Huang, L., Wu, G., Zhi, X., Li, W., Dodsworth, J.A., Hedlund, B.P., Zhang, C., Hartnett, H.E., Dijkstra, P., Hungate, B.A. (2013) A Comprehensive Census of Microbial Diversity in Hot Springs of Tengchong, Yunnan Province China Using 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *PLoS ONE*, 8(1), p.e53350. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0053350
96. Hu, L., Ru, K., Zhang, L., Huang, Y., Zhu, X., Liu, H., Zetterberg, A., Cheng, T., Miao, W. (2014) Fluorescence in situ hybridization (FISH): an increasingly demanded tool for biomarker research and personalized medicine. *Biomarker Research*, 2(1), p.3. doi: doi.org/10.1186/2050-7771-2-3
97. Huang, Q., Dong, C.Z., Dong, R.M., Jiang, H., Wang, S., Wang, G., Fang, B., Ding, X., Niu, L., Li, X., Zhang, C., Dong, H. (2011) Archaeal and bacterial diversity in hot springs on the Tibetan Plateau, China. *Extremophiles*, 15(5), 549–563. doi: 10.1007/s00792-011-0386-z
98. Huang, Q., Jiang, H., Briggs, B.R., Wang, S., Hou, W., Li, G., Wu, G., Solis, R., Arcilla, C.A., Abrajano, T., Dong, H. (2013) Archaeal and bacterial diversity in acidic to circumneutral hot springs in the Philippines. *FEMS microbiology ecology*, 85(3), 452–464. doi: 10.1111/1574-6941.12134
99. Huang, Y., Li, X.-T., Jiang, Z., Liang, Z.-L., Wang, P., Liu, Z.-H., Li, L.-Z., Yin, H.-Q., Jia, Y., Huang, Z.-S., Liu, S.-J., Jiang, C.-Y. (2021) Key Factors Governing Microbial Community in Extremely Acidic Mine Drainage (pH). *Frontiers in Microbiology*, 12, p.761579. doi: 10.3389/fmicb.2021.761579
100. Inskeep, W., Jay, Z.J., Tringe, S.G., Herrgård, M.J., Rusch, D.B., YNP Metagenome Project Steering Committee, Working Group Members (2013) The YNP metagenome project: environmental parameters responsible for microbial distribution in the Yellowstone geothermal ecosystem. *Frontiers in Microbiology*, 4. doi: 10.3389/fmicb.2013.00067

101. Ismail, M., Yahaya, N., Abu Bakar, A., N.M. Noor, N. N. (2018) Cultivation of sulphate reducing bacteria in different media. *Malaysian Journal of Civil Engineering*, 26(3). doi: doi.org/10.11113/mjce.v26.15903
102. Ivančić Šantek, M. (2020). Osvježimo znanje: Mikroorganizmi u biotehnološkoj proizvodnji. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 69(7-8), 419–420.
103. Jabari, L., Gannoun, H., Khelifi, E., Cayol, J.-L., Godon, J.-J., Hamdi, M., Fardeau, M.-L. (2016) Bacterial ecology of abattoir wastewater treated by an anaerobic digester. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 73–84. doi: doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.029
104. Jackson, B.E., Bhupathiraju, V.K., Tanner, R.S., Woese, C.R., McInerney, M.J. (1999) *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Archives of Microbiology*, 171(2), 107–114. doi: 10.1007/s002030050685
105. Jaenicke, R., Sterner, R. (2006) Life at High Temperatures. *The Prokaryotes*, 167–209. doi: 10.1007/0-387-30742-7_7
106. Jeong, M., Kim, J.I., Nam, S.W., Shin, W. (2021) Molecular Phylogeny and Taxonomy of the Genus *Spumella* (Chrysophyceae) Based on Morphological and Molecular Evidence. *Frontiers in Plant Science*, 12. doi: doi.org/10.3389/fpls.2021.758067
107. Jian Luo, F., Lin, W.-T., Guo, Y. (2011) Functional genes based analysis of sulfur-oxidizing bacteria community in sulfide removing bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(2), 769–778. doi: 10.1007/s00253-010-3061-x
108. Jiang, Y., Chen, X., Lou, K., Mao, P.H. (2013) Cultivable soil actinomycete communities in some areas of western China. *Academia Journal of Biotechnology*, Vol.1., No.1., 1 – 13.
109. Jong Min, K., Jeong, M.-S., Archibald, J.M., Shin, W. (2020) Comparative Plastid Genomics of Non-Photosynthetic Chrysophytes: Genome Reduction and Compaction. *Front. Plant Sci.*, 11. doi: doi.org/10.3389/fpls.2020.572703
110. Jordan, M.I., Mitchell, T.M. (2015) Machine learning: Trends, perspectives, and prospects. *Science*, 349(6245), 255–260. doi: doi.org/10.1126/science.aaa8415
111. Jorquera, M.A., Graether, S.P., Maruyama, F. (2019) Editorial: Bioprospecting and Biotechnology of Extremophiles. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 7:204. doi: 3389/fbioe.2019.00204
112. Jurilj, Ž., Cazin, V. (2019) Eksploatacijsko polje geotermalne vode Zagreb i mogućnosti njezinog korištenja. *Nafta i plin*, 62 – 73.
113. Kambura, A.K., Mwirichia, R.K., Kasili, R.W., Karanja, E.N., Makonde, H.M., Boga, H.I. (2016) Bacteria and Archaea diversity within the hot springs of Lake Magadi and Little Magadi in Kenya. *BMC Microbiology*, 16(1). doi: 10.1186/s12866-016-0748-x
114. Kandeler, E., Gerber, H. (1988) Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*, 6(1). doi: doi.org/10.1007/bf00257924
115. Karst, S., Albertsen, M., Kirkegaard, R., Dueholm Per, M., Nielsen, H. (2016) Molecular methods.

116. Kassambara (2023) STHDA ggpubr R Package: ggplot2-Based Publication Ready Plots.
117. Kavitate, D., Singh, S.P., Kandasamy, S., Devi, P.B., Shetty, P.H. (2020) Report on aflatoxin-binding activity of galactan exopolysaccharide produced by *Weissella confusa* KR780676. *3 Biotech*, 10(4). doi: doi.org/10.1007/s13205-020-02173-w
118. Kirchman, D.L. (2008) Introduction and overview. *Microbial Ecology of the Oceans*, 2. izd. Wiley-Blackwell, New Jersey, 1 – 26.
119. Koch, H., van Kessel, M.A.H.J., Lucker, S. (2018) Complete nitrification insights into the ecophysiology of comammox *Nitrospira*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103 (1): 177-189. doi: 10.1007/s00253-018-9486-3
120. Kormas, K., Tamaki, H., Hanada, S., Kamagata, Y. (2009) Apparent richness and community composition of Bacteria and Archaea in geothermal springs. *Aquatic Microbial Ecology*, 57, 113–122. doi: 10.3354/ame01333
121. Kostešić, E., Mitrović, M., Kajan, K., Marković, T., Hausmann, B., Orlić, S., Pjevac, P. (2023) Microbial Diversity and Activity of Biofilms from Geothermal Springs in Croatia. *Microbial Ecology*. doi: doi.org/10.1007/s00248-023-02239-1
122. Krogmann, U., Woyczehowski, H. (2000) Selected characteristics of leachate, condensate and runoff released during composting of biogenic waste. *Waste Management & Research* 18(3), 235-248.
123. Kučić Grgić, D., Vuković Domanovac, M., Domanovac, T., Šabić, M., Cvetnić, M., Ocelić Bulatović, V. (2019) Influence of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* BSW and Clinoptilolite addition on the biowaste composting process. *Arabian journal for science and engineering*, 44(6), 5399–5409. doi: doi.org/10.1007/s13369-018-03692-8
124. Kurtanjek, Ž. (2022) Kauzalni ekološki model sjevernog Jadrana temeljem podataka EU projekta ‘LTER Northern Adriatic Sea’. *Kemija u industriji*, (11-12). doi: doi.org/10.15255/kui.2022.033
125. Kurtanjek, Ž. (2021) Važnost analize kauzalnosti za studije kemije i kemijskog inženjerstva. *Kem. Ind*, 70(7-8), 467–471.
126. Lagier, J.-C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P.-E., La Scola, B., Raoult, D. (2015) The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 237–264. doi: doi.org/10.1128/cmr.00014-14
127. Lagostina, L., Frandsen, S., MacGregor, B.J., Glombitza, C., Deng, L., Fiskal, A., Li, J., Doll, M., Geilert, S., Schmidt, M., Scholz, F., Bernasconi, S.M., Jørgensen, B.B., Hensen, C., Teske, A. and Lever, M.A. (2021) Interactions between temperature and energy supply drive microbial communities in hydrothermal sediment. *Communications Biology*, 4(1), 1–14. doi: 10.1038/s42003-021-02507-1
128. Lahti, L., Shetty, S. (2012-2019) “microbiome R package.”, version 1.16. <http://microbiome.github.io>
129. Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. John Wiley and Sons, New York, 115-175.

130. Lata, P., Kumari, R., Sharma, K.K., Shailja, R., Savitri (2022) In vitro evaluation of probiotic potential and enzymatic profiling of *Pichia kudriavzevii* Y33 isolated from traditional home-made mango pickle. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1). doi: doi.org/10.1186/s43141-022-00416-2
131. Lebedeva, E.V., Alawi, M., Fiencke, C., Namsaraev, B., Bock, E., Spieck, E. (2005) Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), 297–306. doi: 10.1016/j.femsec.2005.04.010
132. Lebedeva, E.V., Hatzenpichler, R., Pelletier, E., Schuster, N., Hauzmayer, S., Bulaev, A., Grigor'eva, N.V., Galushko, A., Schmid, M., Palatinszky, M., Le Paslier, D., Daims, H., Wagner, M. (2013) Enrichment and Genome Sequence of the Group I.1a Ammonia-Oxidizing Archaeon 'Ca. Nitrosotenuis uzonensis' Representing a Clade Globally Distributed in Thermal Habitats. *PLoS ONE*, 8(11), p.e80835. doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0080835
133. Lee, E.M., Jeon, C.O., Choi, I., Chang, K.-S. and Kim, C.-J. (2005) *Silanimonas lenta* gen. nov., sp. nov., a slightly thermophilic and alkaliphilic gammaproteobacterium isolated from a hot spring. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1), 385–389. doi: doi.org/10.1099/ijs.0.63328-0
134. Levinsen, H., Turner, J.T., Nielsen, T.G., Hansen, B.W. (2000) On the trophic coupling between protists and copepods in arctic marine ecosystems. *Mar Ecol Prog Ser.*, 204: 65–77.
135. Li, X.-F., Li, Q.-K., Cheng, J., Liu, L., Yan, Q., Wu, Y., Zhang, X.-H., Wang, Z.-Y., Qiu, Q., Luo, Y. (2016) Conversion of Dinitrogen to Ammonia by FeN₃-Embedded Graphene. *Journal of the American Chemical Society*, 138(28), 8706–8709. doi: 10.1021/jacs.6b04778
136. Liu, Y., Balkwill, D.L., Aldrich, H.C., Drake, G.R., Boone, D.R. (1999) Characterization of the anaerobic propionate-degrading syntrophs *Smithella propionica* gen. nov., sp. nov. and *Syntrophobacter wolinii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), 545–556. doi: 10.1099/00207713-49-2-545
137. Lojo-Kadrić, N., Pojskić, N., Pojskić, L. (2018) Laboratorijske tehnologije u molekularnoj biologiji.
138. López-López, O., Cerdán E., González-Siso, M.I. (2013) Hot Spring Metagenomics. *Life* 3(2), 208-320. doi: 10.3390/life3020308
139. Love, M.I., Huber, W., Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). doi: doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8
140. Lucker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Damste, J.S.S., Spieck, E., Le Paslier, D., Daims, H. (2010) A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30), 13479–13484. doi: doi.org/10.1073/pnas.1003860107
141. Lund1, J.W., Bjelm, L., Bloomquist, G., Mortensen, A.K. (2008) Characteristics, development and utilization of geothermal resources-a Nordic perspective. *Episodes*, 31 (1), 140–147.

142. Maddela, N.R., Gan, Z., Meng, Y., Fan, F., Meng, F. (2022) Occurrence and Roles of Comammox Bacteria in Water and Wastewater Treatment Systems: A Critical Review. *Engineering*, 17, 196–206. doi: doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.024
143. Mangrola, A., Dudhagara, P., Koringa, P., Joshi, C.G., Parmar, M., Patel, R. (2015) Deciphering the microbiota of Tuwa hot spring, India using shotgun metagenomic sequencing approach. *Genomics Data*, 4, 153–155. doi: doi.org/10.1016/j.gdata.2015.04.014
144. Marković, S. (2002) Hrvatske mineralne sirovine. Institut za geološka istraživanja Zagreb, Zavod za geologiju, 560.
145. Marković, T. (2012) Hidrogeokemijske značajke geotermalne vode na području Julijevo parka u Daruvaru. *Rad. Zavoda za Znan. i umjetnički rad u Bjelovar.*, 6(6), 127–136.
146. Marković, T., Borović, S., Larva, O. (2015) Geochemical characteristics of thermal waters of Hrvatsko zagorje. *Geologia Croatica: journal of the Croatian Geological Survey and the Croatian Geological Society*, 68, 1; 67-77. doi: 10.4154/GC.2015.05
147. Marković, T., Borović, S., Larva, O. (2016) Primjena stabilnih izotopa kisika i vodika u istraživanjima termalnih sustava. *Zbornik radova, Beograd*, 265-268.
148. Marković, T., Sladović, Ž., Domitrović, D., Karlović, I., Larva, O. (2022) Current utilization and hydrochemical characteristics of geothermal aquifers in the Bjelovar sub-depression. *Geologia Croatica: journal of the Croatian Geological Survey and the Croatian Geological Society*, 75, 2; 223-233. doi: 10.4154/gc.2022.21
149. Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1), 10. doi: doi.org/10.14806/ej.17.1.200
150. Matsuda, K., Tsuji, H., Asahara, T., Kado, Y., Nomoto, K. (2007) Sensitive Quantitative Detection of Commensal Bacteria by rRNA-Targeted Reverse Transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 32–39. doi: doi.org/10.1128/aem.01224-06
151. McDonald, D., Price, M.N., Goodrich, J., Nawrocki, E.P., DeSantis, T.Z., Probst, A., Andersen, G.L., Knight, R., Hugenholtz, P. (2011) An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME Journal*, 6(3), 610–618. doi: doi.org/10.1038/ismej.2011.139
152. McIlroy, S.J., Saunders, A.M., Albertsen, M., Nierychlo, M., McIlroy, B., Hansen, A.A., Karst, S.M., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H. (2015) MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database*, p.bav062. doi: doi.org/10.1093/database/bav062
153. McMurdie, P.J., Holmes, S. (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), p.e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217
154. Medeiros, P.M., Seidel, M., Gifford, S.M., Ballantyne, F., Dittmar, T., Whitman, W.B., Moran, M.A. (2017) Microbially-Mediated Transformations of Estuarine Dissolved Organic Matter. *Front. Mar. Sci.* 4, 69.
155. Mehetre, G., Leo, V.V., Singh, G., Dhawre, P., Maksimov, I., Mukesh, Y., Updhyaya, K., Singh, B. P. (2021) Biocontrol potential and applications of extremophiles for sustainable

agriculture, Microbiomes of extreme environments. CRC Press, 1st Edition. doi: 10.1201/9780429328633-13

156. Mendoza, L., Taylor, J.W., Ajello, L. (2002) The Class Mesomycetozoa: A Heterogeneous Group of Microorganisms at the Animal-Fungal Boundary. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 315–344. doi: doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160950

157. Merkel, A. Y., Pimenov, N. V., Ivanovich Rusanov, I., Slobodkin, A., Slobodkina, G. B., Tarnovetskii I. Yu, Frolov, E. N., Dubin, A. V., Perevalova A. A., Bonch-Osmolovskaya E. A. (2017) Microbial diversity and autotrophic activity in Kamchatka hot springs. *Extremophiles*, 21(2): 307-317. doi: 10.1007/s00792-016-0903-1

158. Metcalf i Eddy, Inc. (2003) *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, 52, McGraw Hill Series in Civil and Environmental Engineering. 4th Edition, McGraw-Hill, New York, 1819.

159. Meziti, A., Nikouli, E., Hatt, J.K., Konstantinidis, K.T., Kormas, K.A. (2021) Time series metagenomic sampling of the Thermopyles, Greece, geothermal springs reveals stable microbial communities dominated by novel sulfur-oxidizing chemoautotrophs. *Environmental Microbiology*, 23(7), 3710–3726. doi: 10.1111/1462-2920.15373

160. Miholić, S. (1944) *Kemijska analiza termalnog vrela u Stubičkim Toplicama*. Zavod za ispitivanje rudarskih i kovinarskih proizvoda u Zagrebu.

161. Mir, M.Y., Hamid, S., Rohela, G.K., Parray, J.A., Kamili, A.N. (2021) Composting and Bioremediation Potential of Thermophiles. *Soil Bioremediation*, 143–174. doi: doi.org/10.1002/9781119547976.ch7

162. Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A. (2001) A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, 5(1), 62–71. doi: doi.org/10.1006/niox.2000.0319

163. Mitrović, M., Kostešić, E., Marković, T., Selak, L., Hausmann, B., Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Microbial community composition and hydrochemistry of underexplored geothermal waters in Croatia. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(6), p.126359. doi: doi.org/10.1016/j.syapm.2022.126359

164. Moeck, I.S. (2014) Catalog of geothermal play types based on geologic controls. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 37, 867–882. doi: 10.1016/j.rser.2014.05.032

165. Mohler Mitman, J.N. (2019) *Growth, Lipid Production and Biodiesel Potential of Chromulina freiburgensis Dofl., An Acidophilic Chrysophyte Isolated from Berkeley Pit Lake - ProQuest*.

166. Mokhtarani, N., Yasrobi, S.Y., Ganjidoust, H. (2015) Optimization of Ozonation Process for a Composting leachate-contaminated soils treatment using response surface method. *The Journal of the International Ozone Association*, 37(3), 279-286.

167. Morrison, D.A. (2009) Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends in Parasitology*, 25(8), 375–382. doi: doi.org/10.1016/j.pt.2009.05.010

168. Muter, O. (2023) Current Trends in Bioaugmentation Tools for Bioremediation: A Critical Review of Advances and Knowledge Gaps. *Microorganisms*, 11(3), p.710. doi: doi.org/10.3390/microorganisms11030710

169. Muyzer G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 317–322.
170. Myrold, D.D. (2021) 15 - Transformations of nitrogen. [online] ScienceDirect.
171. Nadell, C.D., Drescher, K., Foster, K.R. (2016) Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14 (9), 589–600. doi: 10.1038/nrmicro.2016.84
172. Najjar, I.N., Sharma, P., Das, S., Sherpa, M.T., Kumar, S., Thakur, N. (2022) Bacterial diversity, physicochemical and geothermometry of South Asian hot springs. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, p.100125. doi: 10.1016/j.crmicr.2022.100125
173. Narsing Rao, M.P., Dong, Z.-Y., Luo, Z.-H., Li, M.-M., Liu, B.-B., Guo, S.-X., Hozzein, W.N., Xiao, M., Li, W.-J. (2021) Physicochemical and Microbial Diversity Analyses of Indian Hot Springs. *Frontiers in Microbiology*, 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.627200
174. NN 26/2020 (2020) Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda.
175. NN 91/2008 (2008) Strategija upravljanja vodama.
176. Nowka, B., Daims, H., Spieck, E. (2015) Comparison of Oxidation Kinetics of Nitrite-Oxidizing Bacteria: Nitrite Availability as a Key Factor in Niche Differentiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 745–753. doi: doi.org/10.1128/AEM.02734-14
177. Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlenn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H. (2019) *vegan: Community Ecology Package*. R-Packages. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
178. Oliverio, A.M., Power, J.F., Washburne, A., Cary, S.C., Stott, M.B., Fierer, N. (2018) The ecology and diversity of microbial eukaryotes in geothermal springs. *The ISME Journal*, 12(8), 1918–1928. doi: doi.org/10.1038/s41396-018-0104-2
179. Oren, A. (2009) Anaerobic Respiration. *Encyclopedia of Life Sciences*. doi: doi.org/10.1002/9780470015902.a0001414.pub2
180. Orsi, W., Song, Y.C., Hallam, S., Edgcomb, V. (2012) Effect of oxygen minimum zone formation on communities of marine protists. *The ISME Journal*, 6(8), 1586–1601. doi: 10.1038/ismej.2012.7
181. Palta, M.M., Hartnett, H.E. (2017) Nitrogen Cycle. *Encyclopedia of Geochemistry*, 1–6. doi: doi.org/10.1007/978-3-319-39193-9_160-1
182. Panda, A.K., Bisht, S.S., De Mandal, S., Kumar, N.S. (2016) Bacterial and archaeal community composition in hot springs from Indo-Burma region, North-east India. *AMB Express*, 6(1). doi: 10.1186/s13568-016-0284-y
183. Parada, A.E., Needham, D.M., Fuhrman, J.A. (2015) Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403–1414. doi: 10.1111/1462-2920.13023
184. Park, B.-J., Park, S.-J., Yoon, D.-N., Schouten, S., Sinninghe Damsté J.S., Rhee, S.-K. (2010) Cultivation of Autotrophic Ammonia-Oxidizing Archaea from Marine Sediments in Coculture

with Sulfur-Oxidizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7575–7587. doi: doi.org/10.1128/aem.01478-10

185. Peach, J.T., Mueller, R.C., Skorupa, D.J., Mesle, M.M., Kanta, S., Boltinghouse, E., Sharon, B., Copié, V., Bothner, B., Peyton, B.M. (2022) Longitudinal analysis of the Five Sisters hot springs in Yellowstone National Park reveals a dynamic thermoalkaline environment. *Scientific Reports*, 12(1), p.18707. doi: doi.org/10.1038/s41598-022-22047-w

186. Peña, D.A., Gasser, B., Zanghellini, J., Steiger, M.G., Mattanovich, D. (2018) Metabolic engineering of *Pichia pastoris*. *Metabolic Engineering*, 50, 2–15. doi: doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.017

187. Periša, J. (2019) Uloga i značaj kompostiranja u održivoj poljoprivredi. Završni rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek.

188. Pester, M., Maixner, F., Berry, D., Rattei, T., Koch, H., Lückner, S., Nowka, B., Richter, A., Spieck, E., Lebedeva, E., Loy, A., Wagner, M., Daims, H. (2014) NxrB encoding the beta subunit of nitrite oxidoreductase as functional and phylogenetic marker for nitrite-oxidizing *Nitrospira*. *Environmental Microbiology*, 16(10), 3055–3071. doi: doi.org/10.1111/1462-2920.12300

189. Pester, M., Rattei, T., Flechl, S., Gröngroft, A., Richter, A., Overmann, J., Reinhold-Hurek, B., Loy, A., Wagner, M. (2011) amoA-based consensus phylogeny of ammonia-oxidizing archaea and deep sequencing of amoA genes from soils of four different geographic regions. *Environmental Microbiology*, 14(2), 525–539. doi: doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02666.x

190. Pichler, M., Hartig, F. (2023) Machine learning and deep learning—A review for ecologists. *Methods in Ecology and Evolution*. doi: doi.org/10.1111/2041-210x.14061

191. Pjevac, P., Kamyshny, A., Dyksma, S., Mußmann, M. (2014) Microbial consumption of zero-valence sulfur in marine benthic habitats. *Environmental Microbiology*, 16(11), 3416–3430. doi: 10.1111/1462-2920.12410

192. Pjevac, P., Korlević, M., Berg, J.S., Bura-Nakić, E., Ciglencečki, I., Amann, R., Orlić, S. (2015) Community Shift from Phototrophic to Chemotrophic Sulfide Oxidation following Anoxic Holomixis in a Stratified Seawater Lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 298–308. doi: 10.1128/aem.02435-14

193. Pjevac, P., Clemens Schaubberger, Lianna Poghosyan, Herbold, C.W., Kessel, van, Daebeler, A., Steinberger, M., Mike, Lückner, S., Wagner, M., Holger Daims (2017) AmoA-Targeted Polymerase Chain Reaction Primers for the Specific Detection and Quantification of *Comammox Nitrospira* in the Environment. *Front. Microbiol.*, 8. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2017.01508

194. Pjevac, P., Hausmann, B., Schwarz, J., Kohl, G., Herbold, C.W., Loy, A., Berry, D. (2021) An Economical and Flexible Dual Barcoding, Two-Step PCR Approach for Highly Multiplexed Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 12, p.669776. doi: 10.3389/fmicb.2021.669776

195. Podar, P.T., Yang, Z., Björnsdóttir, S.H., Podar, M. (2020) Comparative Analysis of Microbial Diversity Across Temperature Gradients in Hot Springs From Yellowstone and Iceland. *Front. Microbiol.* 11:1625. doi: 10.3389/fmicb.2020.01625

196. Poretsky, R.S., Gifford, S., Rinta-Kanto, J., Vila-Costa, M., Moran, M.A. (2009) Analyzing gene expression from marine microbial communities using environmental transcriptomics. *JoVE*, 24, 1086. doi: 10.3791/1086
197. Power, J.F., Carere, C.R., Lee, C.K., Wakerley, G.L.J., Evans, D.W., Button, M., White, D., Climo, M.D., Hinze, A.M., Morgan, X.C., McDonald, I.R., Cary, S.C., Stott, M.B. (2018) Microbial biogeography of 925 geothermal springs in New Zealand. *Nature Communications*, 9(1), p.2876. doi: 10.1038/s41467-018-05020-y
198. Pruesse, E., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28(14), 1823–1829. doi: 10.1093/bioinformatics/bts252
199. Pumas, C., Pruetiworanan, S., Peerapornpisal, Y. (2018) Diatom diversity in some hot springs of northern Thailand. *Botanica* 24: 69–86.
200. Purcell, D., Sompong, U., Yim, L.C., Barraclough, T.G., Peerapornpisal, Y., Pointing, S.B. (2007) The effects of temperature, pH and sulfide on the community structure of hyperthermophilic streamers in hot springs of northern Thailand. *FEMS Microbiology Ecology*, 60, 456–466. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00302.x
201. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F.O. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. doi: doi.org/10.1093/nar/gks1219
202. Raj, S.K., Rani, V., Sharma, S., Verma, M.L. (2021) Screening of Microbial Enzymes and Their Potential Applications in the Bioremediation Process. *Microbial Products for Health, Environment and Agriculture*, 359–378. doi: doi.org/10.1007/978-981-16-1947-2_16
203. Ramaley, R.F., Scanlan, P.L., O'Dell, W.D. (2001) Presence of thermophilic *Naegleria* isolates in the Yellowstone and Grand Teton national parks. *Thermophiles Biodiversity, Ecology, and Evolution*, SAD, Springer, 41–50.
204. Raposo, P., Viver, T., Albuquerque, L., Froufe, H., Barroso, C., Egas, C., Rosselló-Móra, R., da Costa, M.S. (2019) Transfer of *Meiothermus chliarophilus* (Tenreiro et al.1995) Nobre et al. 1996, *Meiothermus roseus* Ming et al. 2016, *Meiothermus terrae* Yu et al. 2014 and *Meiothermus timidus* Pires et al. 2005, to *Calidithermus* gen. nov., as *Calidithermus chliarophilus* comb. nov., *Calidithermus roseus* comb. nov., *Calidithermus terrae* comb. nov. and *Calidithermus timidus* comb. nov., respectively, and emended description of the genus *Meiothermus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(4), 1060–1069. doi: doi.org/10.1099/ijsem.0.003270
205. R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>
206. Reichle, V.F., Petrov, D.P., Weber, V., Jung, K., Kellner, S. (2019) NAIL-MS reveals the repair of 2-methylthiocytidine by AlkB in *E. coli*. *Nature Communications*, 10(1), p.5600. doi: doi.org/10.1038/s41467-019-13565-9

207. Rezić, I., Kracher, D., Oros, D., Mujadžić, S., Anđelini, M., Kurtanjek, Ž., Roland, L., Rezić, T. (2022) Application of Causality Modelling for Prediction of Molecular Properties for Textile Dyes Degradation by LPMO. *Molecules*, 27, 1, 14. doi: 10.3390/molecules27196390
208. Rezić, T., Vrsalović Presečki, A., Kurtanjek, Ž. (2021) New approach to the evaluation of lignocellulose derived by-products impact on lytic-polysaccharide monooxygenase activity by using molecular descriptor structural causality model. *Bioresource technology*, 342, 125990, 5. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125990
209. Ribeiro, M.T., Singh, S., Guestrin, C. (2016) ‘Why Should I Trust You?’ Proceedings of the 22nd ACM SIGKDD International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining - KDD '16. doi:https://doi.org/10.1145/2939672.2939778
210. Rodriguez-Caballero, A., Ribera, A., Balcázar, J.L., Pijuan, M. (2013) Nitrification versus full nitrification of ammonium-rich wastewater: Comparison in terms of nitrous and nitricoxides emissions. *Bioresource Technology*, 139: 195–202. doi: 10.1016/j.biortech.2013.04.021
211. Romero, C., Ramos, P., Costa, C., Márquez, M.C. (2013) Raw and digested municipal waste compost leachate as potential fertilizer: comparison with a commercial fertilizer, *J. Clean. Prod.* 59: 115-122.
212. Rothauwe, J.H., Witzel, K.P., Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene amoA as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Applied and environmental microbiology*, 63(12), 4704–4712. doi: doi.org/10.1128/aem.63.12.4704-4712.1997
213. Runge, J. (2023) Modern causal inference approaches to investigate biodiversity-ecosystem functioning relationships. *Nature Communications*, 14(1). doi: doi.org/10.1038/s41467-023-37546-1
214. Rupasinghe, R., Amarasena, S., Wickramaratna, S., Biggs, P.J., Chandrajith, R., Wickramasinghe, S. (2022) Microbial diversity and ecology of geothermal springs in the high-grade metamorphic terrain of Sri Lanka. *Environmental Advances*, 7, p.100166. doi: 10.1016/j.envadv.2022.100166
215. Saghatelian, A., Margaryan, A., Panosyan, H. and Birkeland, N.-K. (2021) Microbial Diversity of Terrestrial Geothermal Springs in Armenia and Nagorno-Karabakh: A Review. *Microorganisms*, 9(7), p.1473. doi: 10.3390/microorganisms9071473
216. Sahay, H., Yadav, A.N., Singh, A.K. (2017) Hot springs of Indian Himalayas: potential sources of microbial diversity and thermostable hydrolytic enzymes. *3 Biotech* 7, 118. doi: 10.1007/s13205-017-0762-1
217. Sahoo, R. K., Subudhi, E., Kumar, M. (2015) Investigation of bacterial diversity of hot springs of Odisha, India. *Genom. Data* 6, 188–190. doi: 10.1016/j.gdata.2015.09.018
218. Sánchez, Ó.J., Ospina, D.A., Montoya, S. (2017) Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*, 69, 136–153. doi: doi.org/10.1016/j.wasman.2017.08.012
219. Santoro A. E. (2016) The do-it-all-nitrifier. *Science*, 351, 342-343, doi: 10.1126/science.aad9839

220. Saxena, R., Dhakan, D.B., Mittal, P., Waiker, P., Chowdhury, A., Ghatak, A., Sharma, V.K. (2017) Metagenomic Analysis of Hot Springs in Central India Reveals Hydrocarbon Degrading Thermophiles and Pathways Essential for Survival in Extreme Environments. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.02123
221. Schejbal, B. (2003) Nova razmatranja o Aquae Balissae i narodu Jaza: pejzaž - vode - etimologija - kultovi – mitologija, pitanje atribucije i kontinuiteta. *Opvscvla Archaeol.*, 27(1), 393–416.
222. Schink, B. (2002) Synergistic interactions in the microbial world. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1/4), 257–261. doi:10.1023/a:1020579004534
223. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J. and Weber, C.F. (2009) Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537–7541. doi: doi.org/10.1128/aem.01541-09
224. Schneider, T., Riedel, K. (2010) Environmental proteomics: analysis of structure and function of microbial communities. *Proteomics* 10: 785–798. doi: 10.1002/pmic.200900450
225. Schurig-Briccio, L.A., Venkatakrisnan, P., Hemp, J., Briccio, C., Berenguer, J., Gennis, R.B. (2013) Characterization of the nitric oxide reductase from *Thermus thermophilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31), 12613–12618. doi: doi.org/10.1073/pnas.1301731110
226. Scutari, M., Vitolo, C., Tucker, A. (2018) Learning Bayesian Networks from Big Data with Greedy Search: Computational Complexity and Efficient Implementation. doi: doi.org/10.48550/arXiv.1804.08137
227. Seckbach, J., Gordon, R. (2019) *Diatoms: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons.
228. Shannon, C.E. (1948) A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3), 379–423. doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x
229. Sharma, A., Kiciman, E. (2021) DoWhy: An End-to-End Library for Causal Inference.
230. Sharma, A., Paul, D., Dhotre, D., Jani, K., Pandey, A., Shouche, Y.S. (2017) Deep sequencing analysis of bacterial community structure of Soldhar hot spring, India. *Microbiology*, 86(1), 136–142. doi: 10.1134/S0026261717010118
231. Sharma, P. K., Singh, K., Singh, R., Capalash, N., Ali, A., Mohammad, O., Kaur, J. (2012) Characterization of a thermostable lipase showing loss of secondary structure at ambient temperature. *Molecular Biology Reports*, 39(3), 2795–2804. doi: 10.1007/s11033-011-1038-1
232. Sikorski, J., Tindall, B.J., Lowry, S.F., Lucas, S., Nolan, M., Copeland, A., Rio, del, Tice, H., Jan Fang Cheng, Han, C., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Mikhailova, N., Pati, A., Goodwin, L., Chen, A.Y., Palaniappan, K., Land, M. (2010) Complete genome sequence of *Meiothermus silvanus* type strain (VI-R2T). *Stand Genomic Sci*, 3(1), 37–46. doi: doi.org/10.4056/sigs.1042812

233. Simon, C., Daniel, R. (2011) Metagenomic analyses: past and future trends. *Appl Environ Microbiol* 77: 1153–1161. doi: 10.1128/AEM.02345-10
234. Singh, S.K., Adhapure, N.N., Sharma, R. (2019) Diversity and Bioprospecting of Yeasts from Extreme Environments. *Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology*, 117–142. doi: doi.org/10.1007/978-981-13-9349-5_5
235. Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., Sharma, P. (2011) Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 10(4), 309–326.
236. Simpson, E.H. (1949) Measurement of Diversity. *Nature*, 163(4148), 688–688. doi: 10.1038/163688a0
237. Solvang, H.K., Subbey, S. (2019) An improved methodology for quantifying causality in complex ecological systems. *PLoS ONE*, 14(1) (e0208078). doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0208078
238. Spieck, E., Lipski, A. (2011) Cultivation, Growth Physiology, and Chemotaxonomy of Nitrite-Oxidizing Bacteria. *Research on Nitrification and Related Processes, Part A*, 109–130. doi: doi.org/10.1016/b978-0-12-381294-0.00005-5
239. Spieck, E., Sass, K., Keuter, S., Hirschmann, S., Spohn, M., Indenbirken, D., Kop, L.F.M., Lücker, S., Giaveno, A. (2020) Defining Culture Conditions for the Hidden Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrolancea*. *Frontiers in Microbiology*, 11, p.1522. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2020.01522
240. Spirtes, P. (2010) Introduction to Causal Inference. *Journal of Machine Learning Research*, 11, 1643–1662.
241. Sriaporn, C. (2022) Terrestrial hot spring environments: prokaryotic adaptation to extreme conditions and biological contributions to geologic records. University of Auckland, 1 – 340.
242. Srpak, M., Sabol, G. (2019) Podravina. 190–200.
243. Stein, L.Y. (2019) Insights into the physiology of ammonia-oxidizing microorganisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 49, 9–15. doi: doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.003
244. Stein, L.Y., Klotz, M.G. (2016) The nitrogen cycle. *Current Biology*, 26(3), R94–R98. doi: doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.021
245. Su C, Lei L, Duan Y, Zhang K-Q, Yang J. (2012) Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93: 993–1003.
246. Šabić, M., Kučić Grgić, D., Vuković Domanovac, M. (2019) Evaluation of biodegradability and environmental impact of biowaste leachate. *The holistic approach to environment*, 9(1), 1–7. doi: doi.org/10.33765/thate.9.1.1.
247. Šimunić, A. (1988) Radovi Zavoda za znanstveni rad Jugoslavenske akademije znanosti i umjetnosti: Geološko - tektonska osnova termomineralnih vrela u Varaždinskim toplicama. *Varaždin. knj.* 2, 9 – 29.

248. Škrlec, M., Živković, S., Kolbah, S., Tumara, D. (2019) Korištenje resursa geotermalne energije u Republici Hrvatskoj. *Nafta i Plin*, 39 (159–160), 51–56.
249. Šumanovac, F., Hegedűs, E., Orešković, J., Kolar, S., Kovács, A.C., Dudjak, D., Kovács, I.J. (2016) Passive seismic experiment and receiver functions analysis to determine crustal structure at the contact of the northern Dinarides and southwestern Pannonian Basin. *Geophysical journal international*, 205(3), 1420–1436. doi: 10.1093/gji/ggw101
250. Šumanovac, F., Orešković, J., Grad, M. (2009) Crustal structure at the contact of the Dinarides and Pannonian basin based on 2-D seismic and gravity interpretation of the Alp07 profile in the ALP 2002 experiment. *Geophysical Journal International*, 179(1), 615–633. doi: 10.1111/j.1365-246X.2009.04288.x
251. Takai, K. (2019) The Nitrogen Cycle: A Large, Fast, and Mystifying Cycle. *Microbes and Environments*, 34(3), 223–225. doi: doi.org/10.1264/jsme2.ME3403rh
252. Tan, B., Ng, C., Nshimyimana, J.P., Loh, L.L., Gin, K.Y.-H., Thompson, J.R. (2015) Next-generation sequencing (NGS) for assessment of microbial water quality: current progress, challenges, and future opportunities. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2015.01027
253. Tobler, D.J., Benning, L.G. (2011) Bacterial diversity in five Icelandic geothermal waters: temperature and sinter growth rate effects. *Extremophiles*, 15(4), 473–485. doi: 10.1007/s00792-011-0378-z
254. Tyrrel, S.F., Seymour, I., Harris, J.A. (2008) Bioremediation of leachate from a green waste composting facility using waste-derived filter media. *Biores. Technol.*, 99(16), 7657-7664.
255. Urbieta, M.S., González-Toril, E., Bazán, Á.A., Giaveno, M.A., Donati, E. (2015) Comparison of the microbial communities of hot springs waters and the microbial biofilms in the acidic geothermal area of Copahue (Neuquén, Argentina). *Extremophiles*, 19(2), 437–450. doi: 10.1007/s00792-015-0729-2
256. Urbieta, M., Toril, E.G., Alejandra Giaveno, M., Bazán, Á.A., Donati, E.R. (2014) Archaeal and bacterial diversity in five different hydrothermal ponds in the Copahue region in Argentina. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(6), 429–441. doi: 10.1016/j.syapm.2014.05.012
257. Uribe-Lorío, L., Brenes-Guillén, L., Hernández-Ascencio, W., Mora-Amador, R., González, G., Ramírez-Umaña, C.J., Díez, B. and Pedrós-Alió, C. (2019) The influence of temperature and pH on bacterial community composition of microbial mats in hot springs from Costa Rica. *MicrobiologyOpen*, 8(10). doi: 10.1002/mbo3.893
258. USDA (2010) Environmental Engineering National Engineering Handbook, Chapter 2 – Composting.
259. Ushiki, N., Fujitani, H., Aoi, Y., Tsuneda, S. (2013) Isolation of *Nitrospira* belonging to Sublineage II from a Wastewater Treatment Plant. *Microbes and Environments*, 28(3), 346–353. doi: doi.org/10.1264/jsme2.me13042
260. Valeriani, F., Crognale, S., Protano, C., Gianfranceschi, G., Orsini, M., Vitali, M., Spica, V.R. (2018) Metagenomic analysis of bacterial community in a travertine depositing hot spring. *The New Microbiologica*, 41(2), 126–135.

261. Van de Peer Y. (1996) A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Res.* 24: 3381–3391.
262. van den Burg, B. (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213–218. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00060-2
263. van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op den Camp, H.J.M., Kartal, B., Jetten, M.S.M., Lücker, S. (2015) Complete nitrification by a single microorganism. *Nature*, 528 (7583), 555–559. doi: doi.org/10.1038/nature16459
264. Vuković Domanovac, M., Vučić, V., Kučić Grgić, D., Šabić Runjavec, M., Vidaković, M., Sudar, M., Zelić, B. (2019a) Improvement of Biowaste Composting Efficiency using *Sphingobium spiritivorum*. doi: doi.org/10.11159/iceptp19.127
265. Vuković Domanovac, M., Šabić Runjavec, M., Janton, N., Kučić Grgić, D. (2019b) Bioremedijacija farmaceutske otpadne vode. *Kemija u industriji*, 68(9-10), 437–445. doi: doi.org/10.15255/kui.2019.028
266. Vylkova, S., Carman, A.J., Danhof, H.A., Collette, J.R., Zhou, H., Lorenz, M.C. (2011) The Fungal Pathogen *Candida albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising Extracellular pH. *mBio*, 2(3). doi: doi.org/10.1128/mBio.00055-11
267. Wang, F., Gao, B., Su, M., Dai, C., Huang, L., Zhang, C. (2019) Integrated biorefinery strategy for tofu wastewater biotransformation and biomass valorization with the filamentous microalga *Tribonema minus*. *Bioresource Technology*, 292, 121938–121938. doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121938
268. Wang, J. (2012) Biological sludge minimization and biomaterials/bioenergy recovery technologies: Fundamentals of biological processes for wastewater treatment. John Wiley i Sons, New Jersey.
269. Wang, L. K., Pereira, N. C., Hung, Y. T. (2009) Biological treatment processes, Humana Press, New York, 207-278.
270. Wardle, D.A. (2006) The influence of biotic interactions on soil biodiversity. *Ecol Lett.* 9: 870–86.
271. Wei T, Simko V (2021) R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92). <https://github.com/taiyun/corrplot>
272. Wemheuer, B., Taube, R., Akyol, P., Wemheuer, F., Daniel, R. (2013) Microbial Diversity and Biochemical Potential Encoded by Thermal Spring Metagenomes Derived from the Kamchatka Peninsula. *Archaea*, 2013, 1–13. doi: doi.org/10.1155/2013/136714
273. Wertz, S., Poly, F., Le Roux, X., Degrange, V. (2008) Development and application of a PCR-denaturing gradient gel electrophoresis tool to study the diversity of *Nitrobacter*-like *nxA* sequences in soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(2), 261–271. doi: doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00416.x
274. Wickham, H. (2011) “The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis.”. *Journal of Statistical Software*, 40 (1), 1–29. <https://www.jstatsoft.org/v40/i01/>

275. Wickham, H. (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
276. Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., Vaughan, D. (2023) *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://github.com/tidyverse/dplyr>
277. Wickham, H., Vaughan, D., Girlich, M. (2023) *tidyr: Tidy Messy Data*. <https://github.com/tidyverse/tidyr>
278. Widdel, F. (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. PhD Thesis, Georg-August-Universität, Göttingen, Germany.
279. Winkler, D., Gfrerer, S., Gescher, J. (2021) Acidophilic Micrarchaeon Seems to Maintain a Slightly Alkaline Cytosolic pH. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2021.05.02.442328
280. Wurzbacher, C., Bärlocher, F., Grossart, H. (2010) Fungi in lake ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, 59, 125–149. doi: doi.org/10.3354/ame01385
281. Yang, S., Li, L., Peng, X., Zhang, R., Song, L. (2022) Eukaryotic community composition and dynamics during solid waste decomposition. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 106(8), 3307–3317. doi: doi.org/10.1007/s00253-022-11912-3
282. Yang, X., Tang, S., Ni, K., Shi, Y., Yi, X., Ma, Q., Cai, Y., Ma, L., Ruan, J. (2023) Long-term nitrogen addition increases denitrification potential and functional gene abundance and changes denitrifying communities in acidic tea plantation soil. *Environmental Research*, 216, p.114679. doi: doi.org/10.1016/j.envres.2022.114679
283. Yazdi, M., Taheri, M., Navi, P. (2014) Environmental geochemistry and sources of natural arsenic in the Kharraqan hot springs, Qazvin, Iran. *Environmental Earth Sciences*, 73(9), 5395–5404. doi: 10.1007/s12665-014-3794-4
284. Ye, L., Wu, X., Liu, B., Yan, D., Kong, F. (2015) Dynamics and sources of dissolved organic carbon during phytoplankton bloom in hypereutrophic Lake Taihu (China). *Limnologia* 54, 5-13.

8. PRILOZI

Prilog 1. Uzorkovani geotermalni lokaliteti s pripadajućim informacijama.

| Lokalitet | Naziv izvora/ bušotine | Oznaka | Tip geotermalnog lokaliteta | Geološka svojstva vodonosnika | Prosječni prinos (L/s) | Dubina bušotine (m) | Vrsta korištenja | Sezona | Filtriran volumen (L) |
|----------------------------|---------------------------|--------|-----------------------------|---|------------------------|---------------------|--|---------------|-----------------------|
| Daruvarske toplice | Antunovo vrelo | AVD | izvor | Karbonati mezozojske starosti | 1,5 | / | Spa Balneologija Rekreacija | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Bizovačke toplice | Biz-4 | BIZ | bušotina | Pijesak/ pješčenjaci panonske starosti | 3,2 | 1530 | Spa Balneologija Rekreacija Grijanje prostora | Jesen 2019 | 1,75 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 9 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 5 |
| Bošnjaci | Bošnjaci-1 | BOS | bušotina | Pijesak/ pješčenjaci panonske starosti | 5 | 1165 | Grijanje staklenika | Jesen 2019 | 3,5 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 6 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 6 |
| Đakovačka Breznica | Đakovačka Breznica | DAB | bušotina | Metamorfni sediment paleozoika | 0,1 | n.a. | Službeno nije u upotrebi. Lokalni mještani koriste ju za rekreaciju. | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 13 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Istarske toplice | Izvor Sv. Stjepan | IST | izvor | Karbonati mezozojske starosti | 2 | / | Spa Balneologija Rekreacija | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2019 | 7 |
| Daruvarske toplice | Ivanovo vrelo | IVD | izvor | Karbonati mezozojske starosti | 5 | / | Spa Balneologija Rekreacija | Proljeće 2020 | 7 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 6 |
| | | | | | | | | Jesen 2019 | 7 |
| Svetojanske toplice | Jana | SJA | izvor | Karbonati mezozojske starosti | 44 | / | Rekreacija | Proljeće 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2019 | 7 |

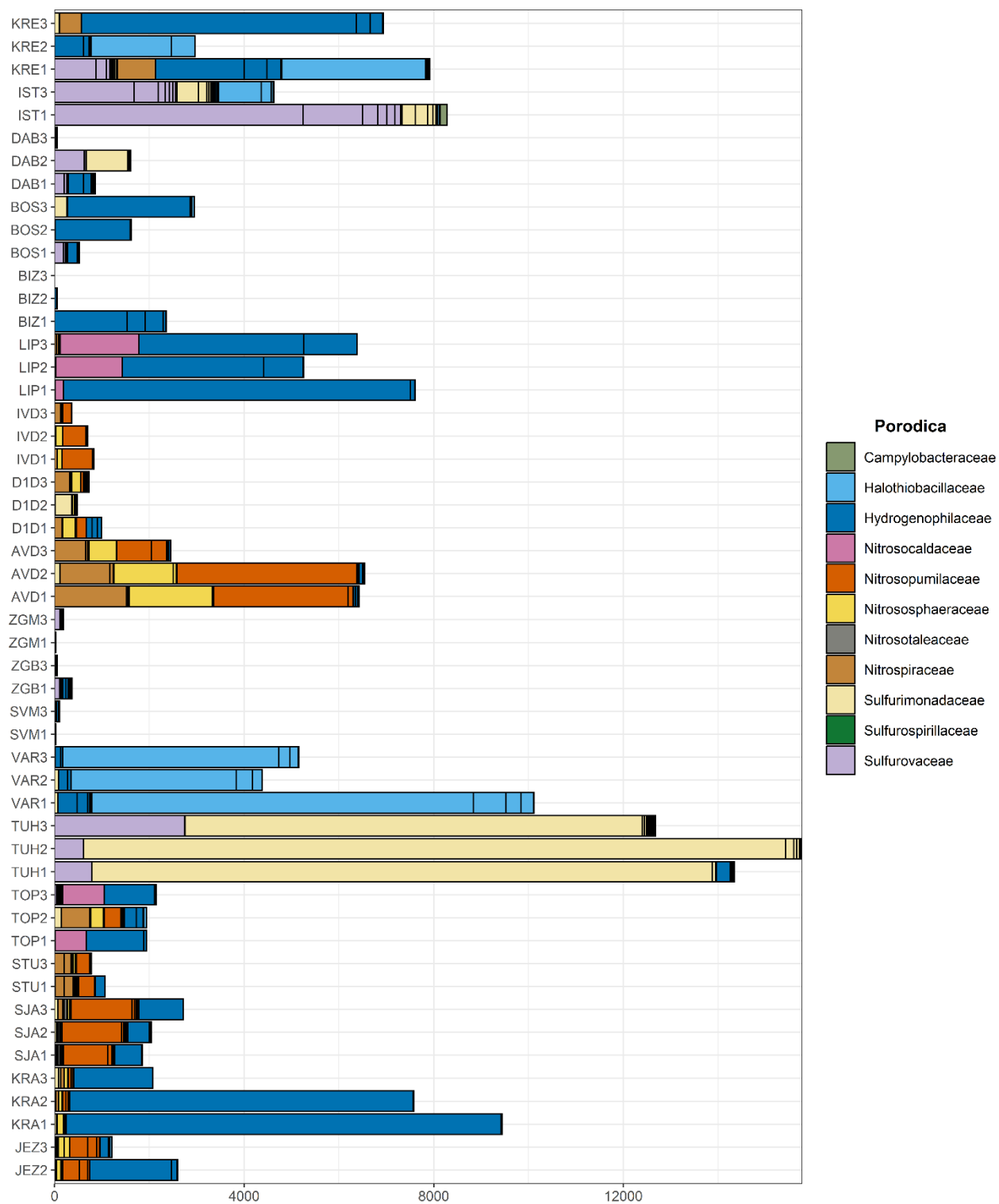
| Lokalitet | Naziv izvora/ bušotine | Oznaka | Tip geotermalnog lokaliteta | Geološka svojstva vodonosnika | Prosječni prinos (L/s) | Dubina bušotine (m) | Vrsta korištenja | Sezona | Filtriran volumen (L) |
|--------------------|---------------------------|--------|-----------------------------|--|------------------------|---------------------|--|---------------|-----------------------|
| Jezerčica | Jezerčica-1 | JEZ | bušotina | Karbonati mezozojske starosti | 5 | 150 | Spa Rekreacija Grijanje prostora | Proljeće 2020 | 13 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Krapinske toplice | Pučka kupelj | KRA | izvor | Karbonati mezozojske starosti | 24 | / | Spa Balneologija Rekreacija Grijanje prostora | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Lipičke toplice | B-4 | LIP | bušotina | Mješavina karbonata mezozojske starosti i metamorfnih sedimentata paleozoika | 4 | 250 | Spa Balneologija Rekreacija Grijanje prostora | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 7 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Daruvarske toplice | Marijino vrelo (D-1) | D1D | bušotina | Karbonati mezozojske starosti | 2 | 8,5 | Spa Balneologija Rekreacija | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 6 |
| Stubičke toplice | B-1 | STU | bušotina | Karbonati mezozojske starosti | 2,5 | 100 | Spa Balneologija Rekreacija Grijanje prostora | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Toplice sv. Martin | Vuč-2 | SVM | bušotina | Mješavina badenskog vapnenca i pijeska | 1,5 | 914 | Spa Rekreacija | Jesen 2019 | 3,5 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 5 |
| Topusko | TEB-2 | TOP | bušotina | Karbonati mezozojske starosti | 24,4 | 150 | Spa Balneologija Rekreacija Grijanje okruga | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |

| Lokalitet | Naziv izvora/ bušotine | Oznaka | Tip geotermalnog lokaliteta | Geološka svojstva vodonosnika | Prosječni prinos (L/s) | Dubina bušotine (m) | Vrsta korištenja | Sezona | Filtriran volumen (L) |
|----------------------------|---------------------------|--------|-----------------------------|--|------------------------|---------------------|--|---------------|-----------------------|
| Tuheljske toplice | Vrelo u Bari | TUH | izvor | Karbonati mezozojske starosti | 13,5 | / | Spa Rekreacija | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Varaždinske toplice | B-1 | VAR | bušotina | Mješavina karbonata mezozojske starosti i metamorfnih sedimentata paleozoika | n.a. | 100 | Spa Balneologija Rekreacija | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 13 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 13 |
| Zagreb Blato | KBNZ-1B | ZGB | bušotina | Karbonati mezozojske starosti | 1,5 | 1065 | Grijanje prostora | Jesen 2019 | 7 |
| Zagreb Mladost | Mla-3 | ZGM | bušotina | Badenski vapnenac i karbonati mezozojske starosti | 9 | 990 | Spa Balneologija Rekreacija Grijanje okruga | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |
| Krečaves | Zelina-1 | KRE | bušotina | Pijesak/ pješčenjaci panonske starosti | 1,5 | 1300 | Službeno nije u upotrebi. Lokalni mještani koriste ju za rekreaciju. | Jesen 2019 | 7 |
| | | | | | | | | Proljeće 2020 | 14 |
| | | | | | | | | Jesen 2020 | 14 |

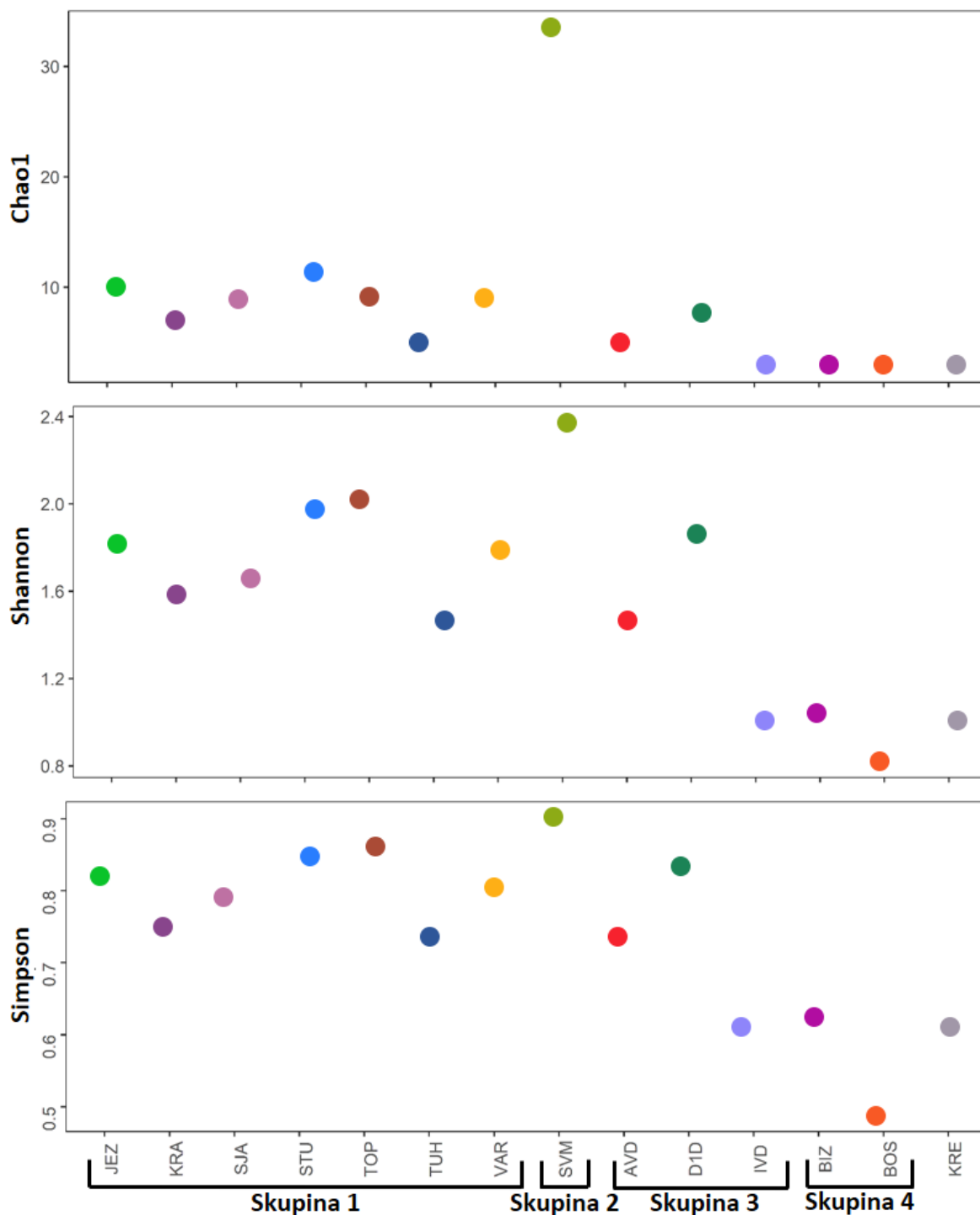


Prilog 2. Sastav prokariotske mikrobne zajednice, identificiran sekvenciranjem amplikona gena 16S rRNA u 51. uzorku vode prikupljenom iz 19 geotermalnih izvora i bušotina diljem Hrvatske.

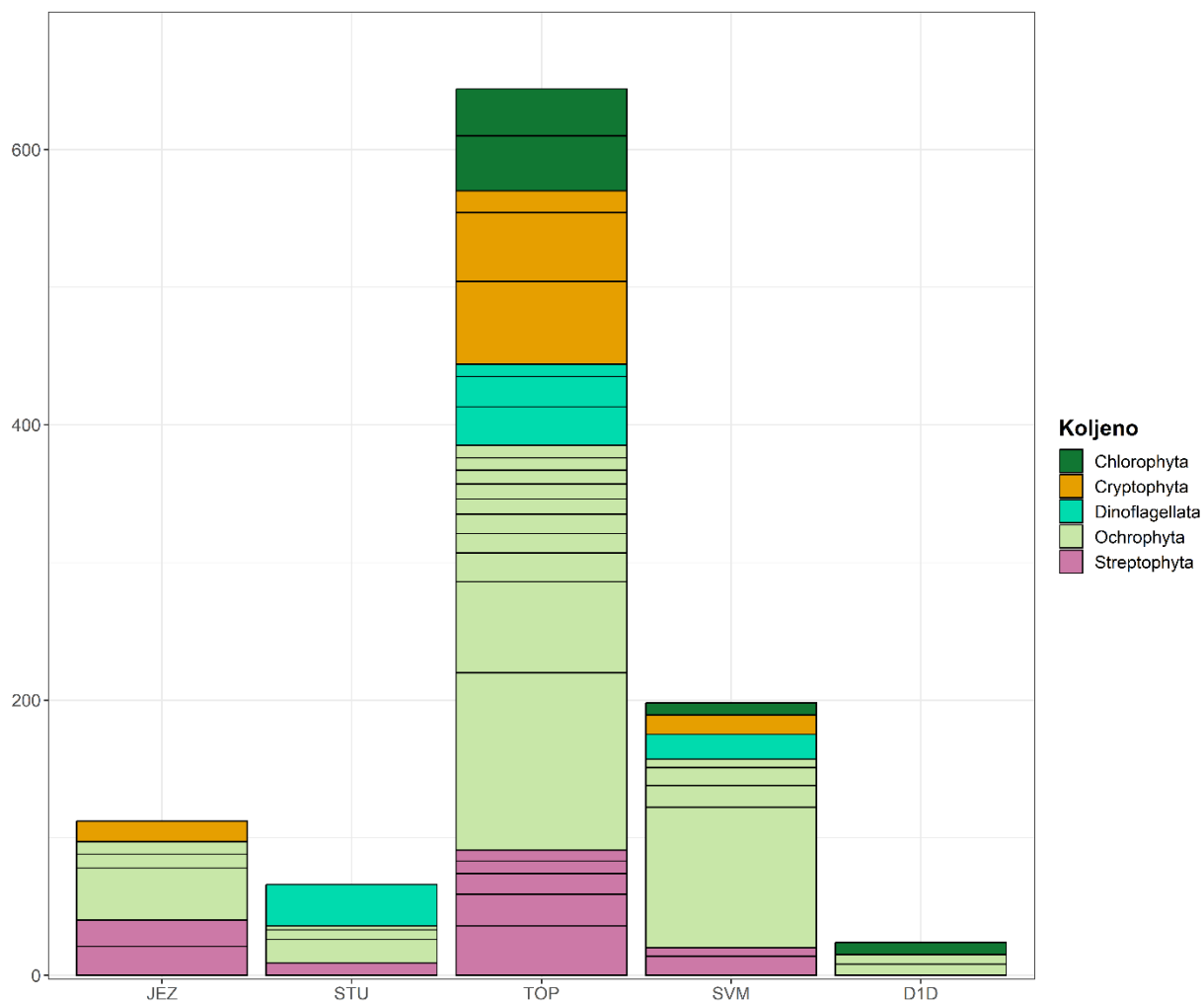
Varijante sekvenci amplikona (ASV) grupirani su na razini koljena. Distribucija vrsta procijenjena je prosječnom relativnom brojnošću od $> 1\%$ u svim geotermalnim vodama gdje su preostali mikrobi s relativnom brojnošću od $< 1\%$ klasificirani kao „Ostatak“.



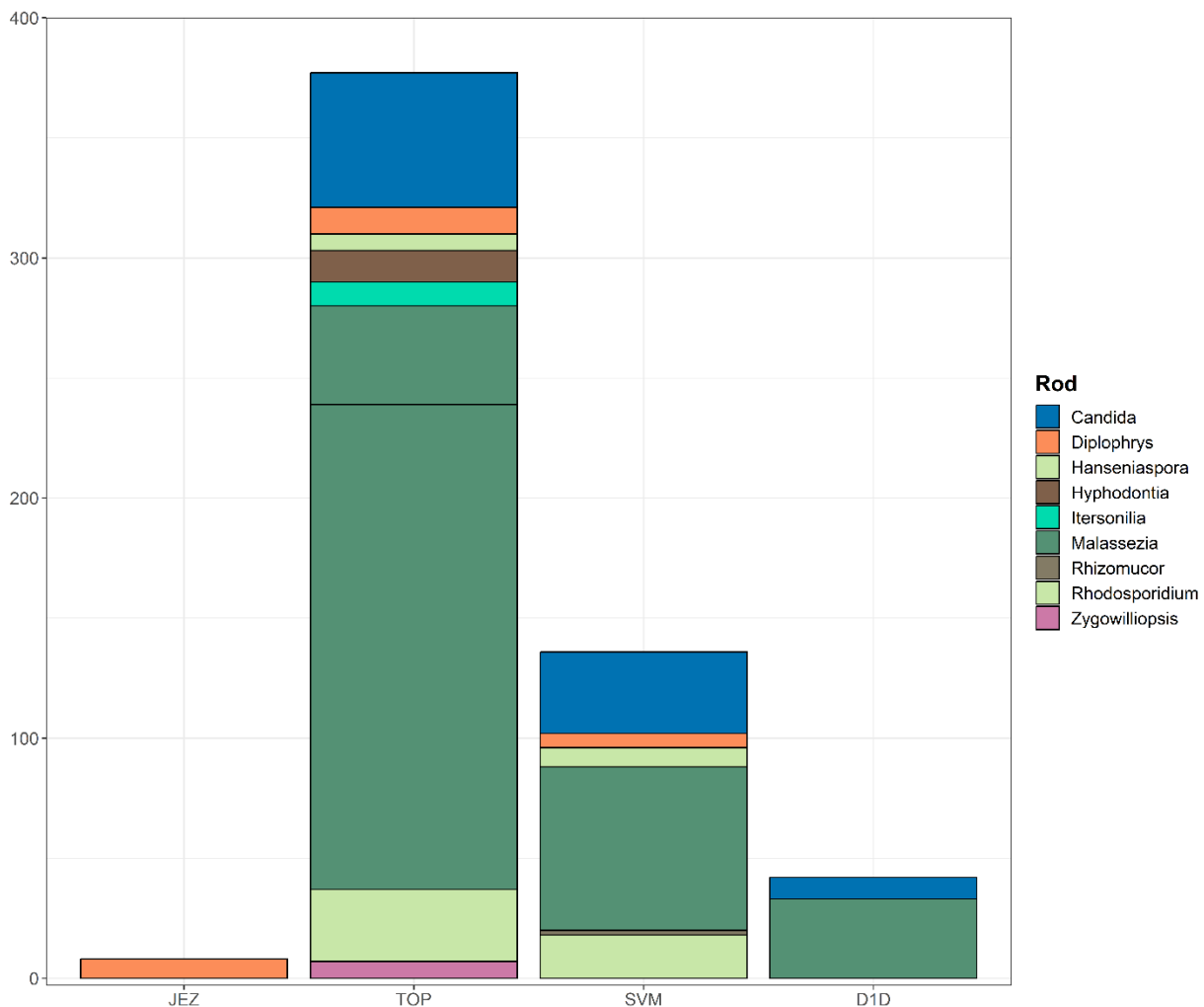
Prilog 3. Sastav prokariotske mikrobne zajednice gdje su ASV-evi grupirani na razini porodice prikazujući stvarnu zastupljenost najčešćih predstavnika vezanih za ciklus N i S (AOA, NOB, comammox i SOB) korišten za izradu matematičkog modela kauzalnosti.



Prilog 4. Indeksi alfa raznolikosti mikrobnih eukariota (gornji graf: brojnost vrsta (Chao1); srednji graf: Shannon indeks raznolikosti; donji graf: Simpson indeks raznolikosti) za 14 ispitivanih lokaliteta podijeljenih vrsti vodonosnika, na temelju prikupljenih uzoraka tijekom jeseni 2020. godine.



Prilog 5. Stvarna zastupljenost koljena izdvojenih na 5 lokaliteta na kojima je utvrđen najveći broj identificiranih mikrobnih eukariota tijekom jeseni 2020. godine. Izdvojena su sva identificirana koljena koja inače sadržavaju poznate predstavnike povezane s procesom primarne produkcije.

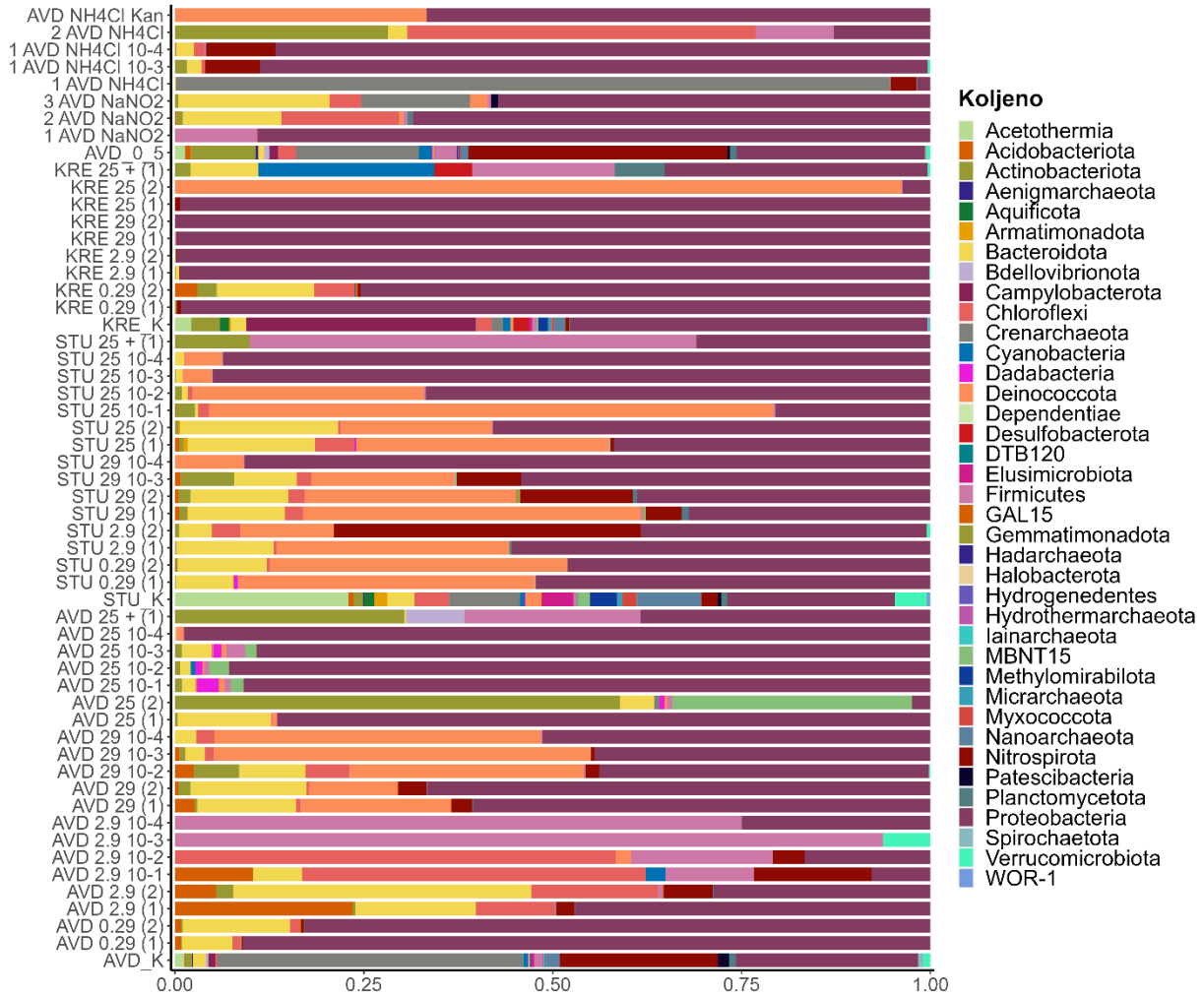


Prilog 6. Stvarna zastupljenost rodova izdvojenih na 4 lokaliteta na kojima je utvrđen najveći broj identificiranih mikrobnih eukariota tijekom jeseni 2020. godine. Izdvojeni su svi identificirani rodovi iz skupina Fungi i Sagenista koji inače sadržavaju poznate predstavnike povezane s procesima razgradnje organske tvari.

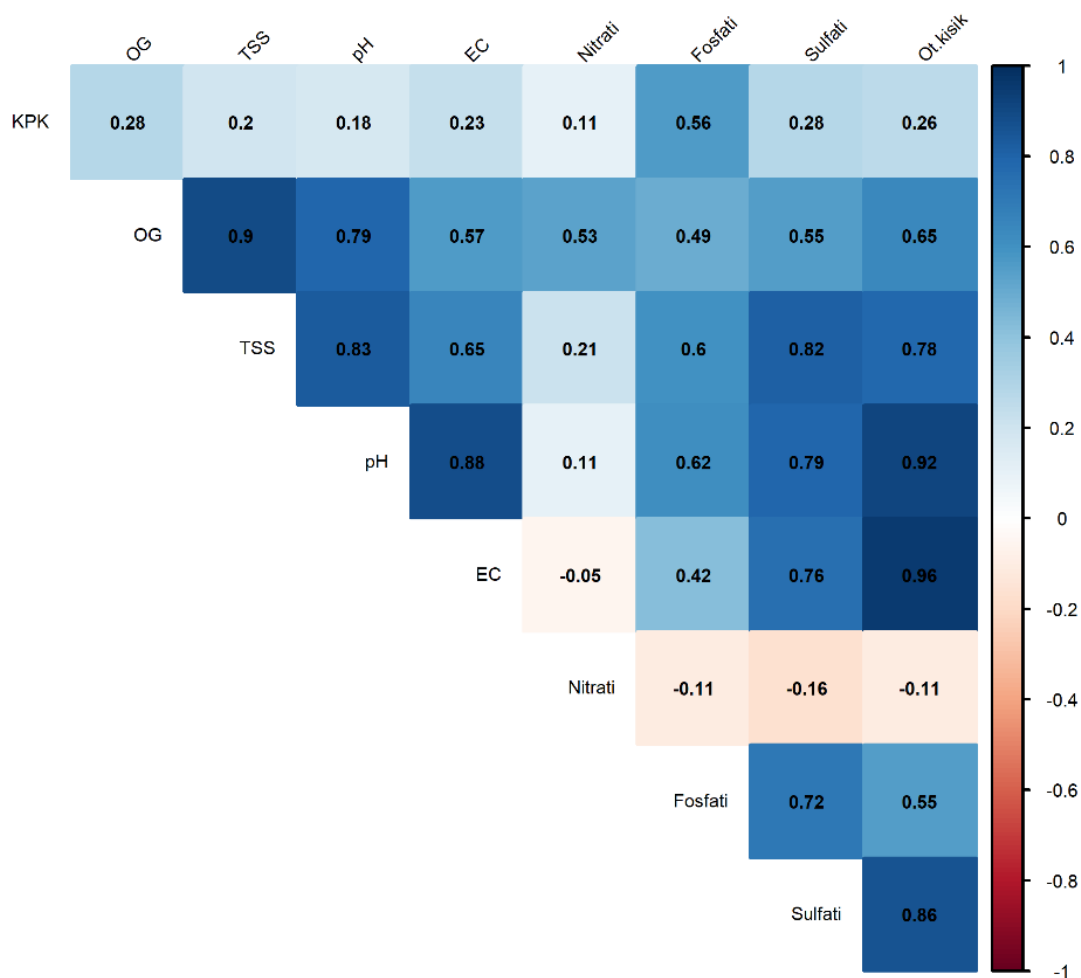
Prilog 7. Rezultati Chao1 (brojnost vrsta), Shannon i Simpson indeksa raznolikosti izračunati na temelju 43 uzoraka kultura. Za potrebe alfa raznolikosti izbačeni su uzorci kultura s manje od 1000 očitavanja.

| Uzorak | Chao1 | Shannon | Simpson |
|---|--------------|----------------|----------------|
| AVD_K | 163.06667 | 3.0618256 | 0.89828092 |
| STU_K | 142.16667 | 3.6146536 | 0.92852593 |
| KRE_K | 104.77273 | 3.7565953 | 0.95790316 |
| AVD_0_5 | 193 | 3.4888384 | 0.88420728 |
| AVD 29 (1) | 24.25 | 1.3543431 | 0.61312921 |
| AVD 2.9 (1) | 58 | 2.2500231 | 0.83606824 |
| AVD 0.29 (1) | 36 | 1.3129051 | 0.52605095 |
| STU 29 (1) | 35.75 | 2.066299 | 0.75871743 |
| STU 2.9 (1) | 23.33333 | 1.3906225 | 0.63305109 |
| STU 0.29 (1) | 28 | 1.6040171 | 0.72983659 |
| KRE 29 (1) | 19.5 | 0.7955632 | 0.42680556 |
| KRE 2.9 (1) | 16 | 1.2728455 | 0.6520427 |
| KRE 0.29 (1) | 23 | 1.0409266 | 0.52584136 |
| AVD 25 (1) | 11 | 0.9362045 | 0.39285048 |
| STU 25 (1) | 22 | 1.7739919 | 0.76293677 |
| KRE 25 (1) | 11 | 1.4761444 | 0.71550188 |
| AVD 29 10⁻² | 24 | 2.0593395 | 0.80358763 |
| AVD 29 10⁻³ | 14.5 | 1.2419375 | 0.63328826 |
| AVD 29 10⁻⁴ | 8 | 0.9313645 | 0.55108384 |
| AVD 2.9 (2) | 37 | 2.3689924 | 0.84068101 |
| AVD 25 10⁻¹ | 18.2 | 1.3121203 | 0.62341189 |
| AVD 25 10⁻² | 18 | 0.8427477 | 0.30229379 |
| AVD 25 10⁻³ | 23.33333 | 1.7095489 | 0.70667161 |
| AVD 25 10⁻⁴ | 6 | 0.1095167 | 0.03596271 |
| 1 AVD NH₄Cl 10⁻⁴ | 19 | 1.3943818 | 0.61573987 |
| 2 AVD NaNO₂ | 22.16667 | 1.6510846 | 0.70126461 |

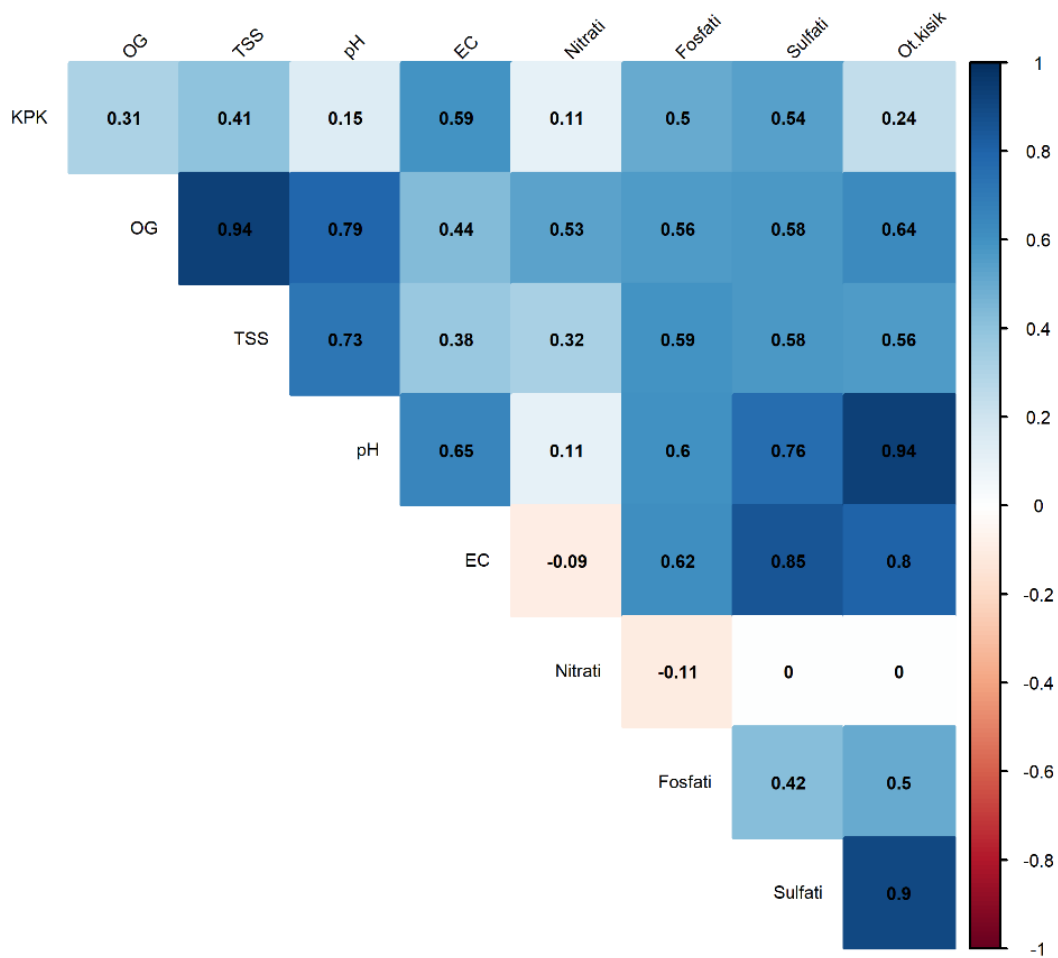
| Uzorak | Chao1 | Shannon | Simpson |
|---|--------------|----------------|----------------|
| STU 25 (2) | 17 | 1.2788637 | 0.64095844 |
| STU 25 10⁻¹ | 15.16667 | 0.9416075 | 0.43834392 |
| STU 25 10⁻² | 28 | 0.8618157 | 0.47934962 |
| STU 25 10⁻³ | 12 | 0.5063962 | 0.22344829 |
| STU 25 10⁻⁴ | 16 | 0.3675097 | 0.13222607 |
| STU 29 10⁻³ | 26 | 1.7086158 | 0.69603594 |
| STU 29 10⁻⁴ | 8 | 0.3231968 | 0.1676593 |
| KRE 25 (2) | 6 | 0.238362 | 0.0907387 |
| KRE 29 (2) | 6 | 1.0218 | 0.56544061 |
| KRE 2.9 (2) | 9.5 | 0.9886533 | 0.55895809 |
| KRE 0.29 (2) | 32.33333 | 2.3891624 | 0.85756939 |
| AVD 29 (2) | 17 | 1.5129695 | 0.6453414 |
| STU 29 (2) | 30 | 1.9887853 | 0.79097742 |
| 1 AVD NH₄Cl 10⁻³ | 24 | 1.1414639 | 0.46462882 |
| AVD 0.29 (2) | 23.5 | 1.5918285 | 0.66005117 |
| 1 AVD NH₄Cl | 12 | 0.9465521 | 0.55186703 |
| STU 0.29 (2) | 21.75 | 1.8994647 | 0.77466082 |



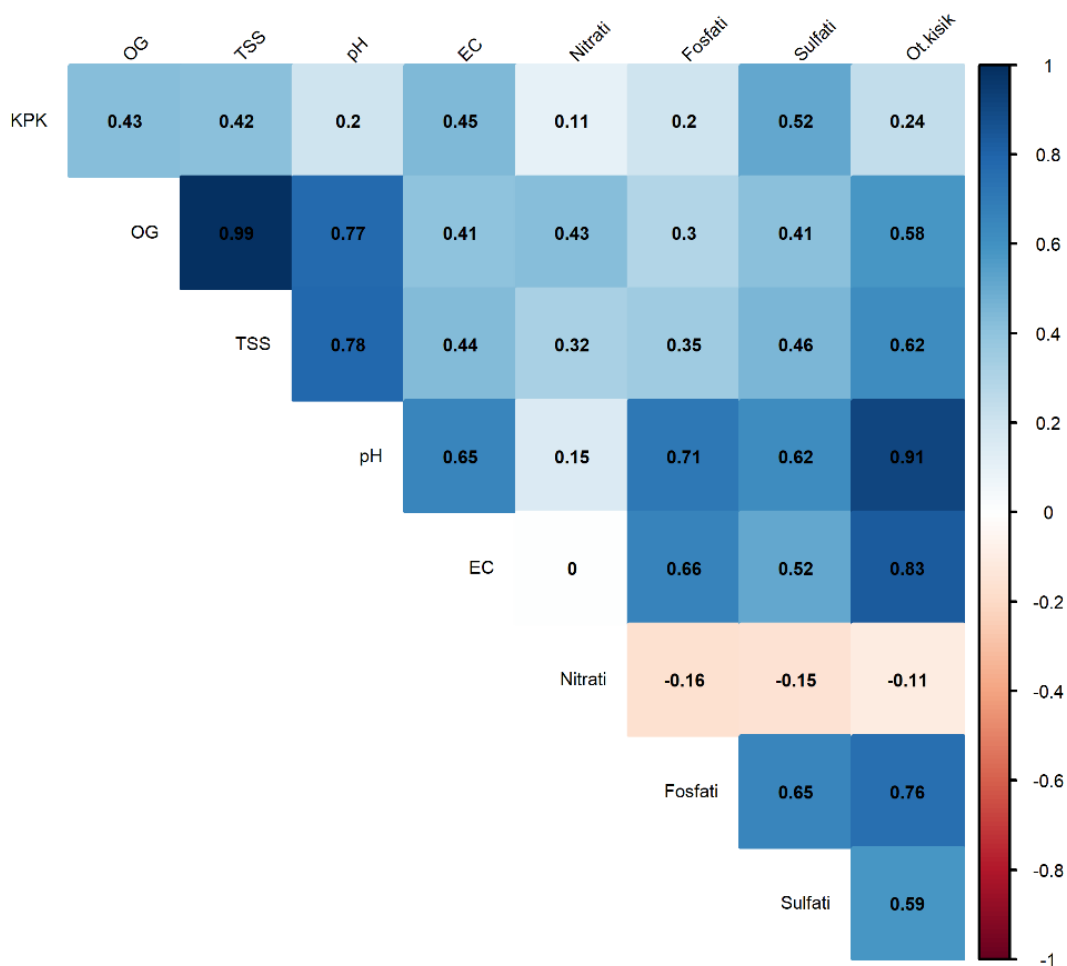
Prilog 8. Relativni sastav prokariotske mikrobne zajednice, identificiran sekvenciranjem amplikona gena 16S rRNA u 56 uzgojenih uzoraka kultura s 3 geotermalna lokaliteta u Hrvatskoj (AVD, STU i KRE). Amplikoni su grupirani na razini koljena, a njihova distribucija prikazana je u postocima.



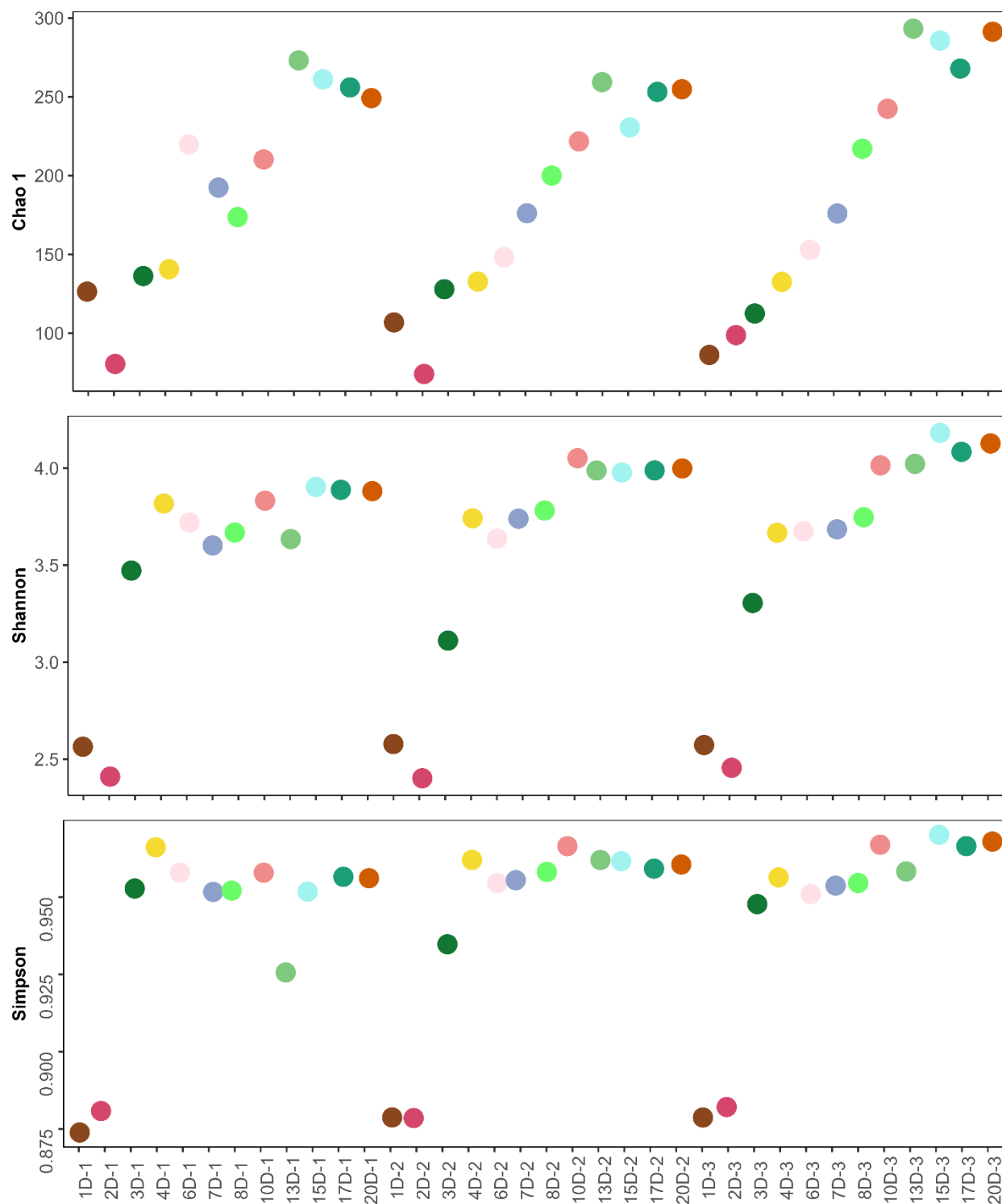
Prilog 9. Korelacijska analiza na bazi Pearson koeficijenta na normaliziranom setu podataka analiziranih fizikalno-kemijskih parametara tijekom kontrolnog Pokusa 1 biološke obrade procjedne vode biootpada.



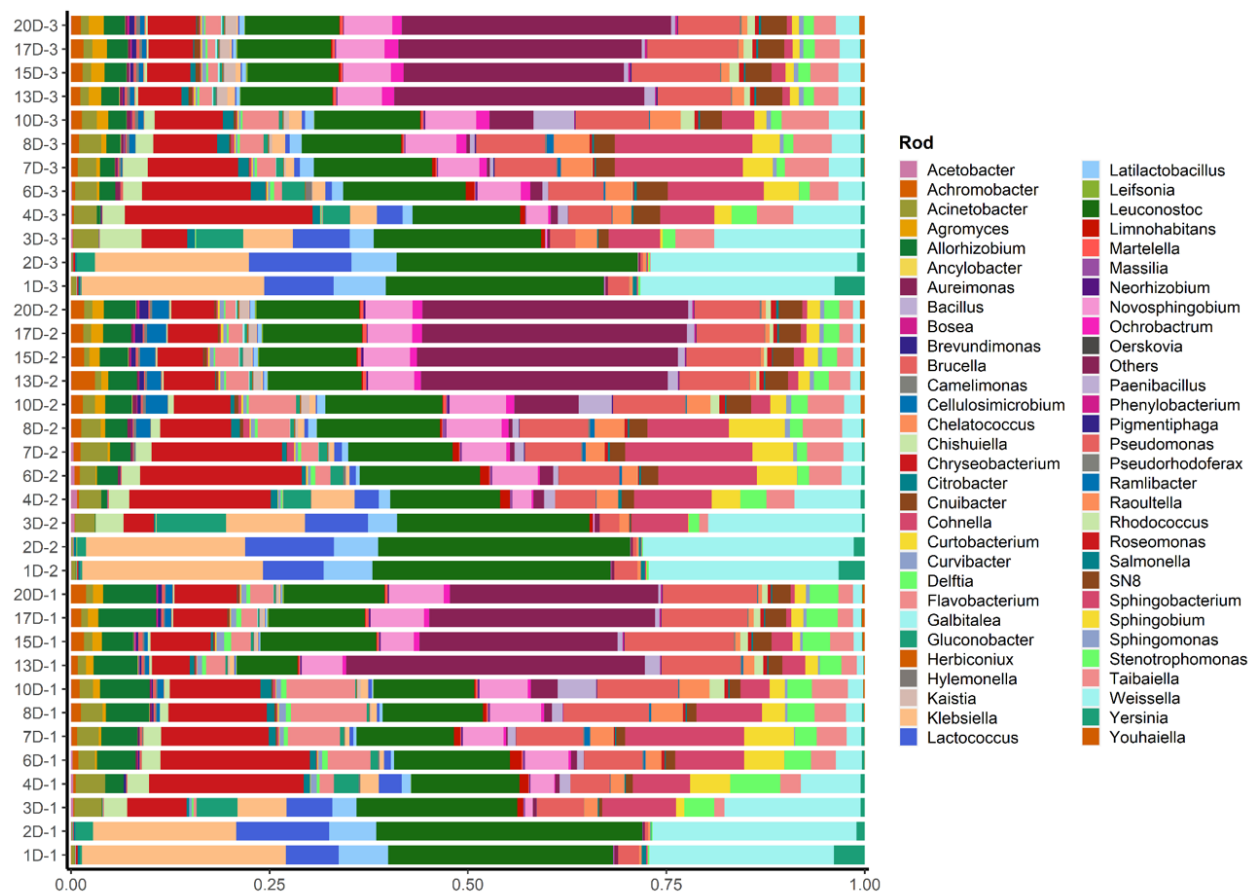
Prilog 10. Korelacijska analiza na bazi Pearson koeficijenta na normaliziranom setu podataka analiziranih fizikalno-kemijskih parametara tijekom Pokusa 2 biološke obrade procjedne vode biootpada s dodatkom mješavine egzogenih kultura lokaliteta KRE.



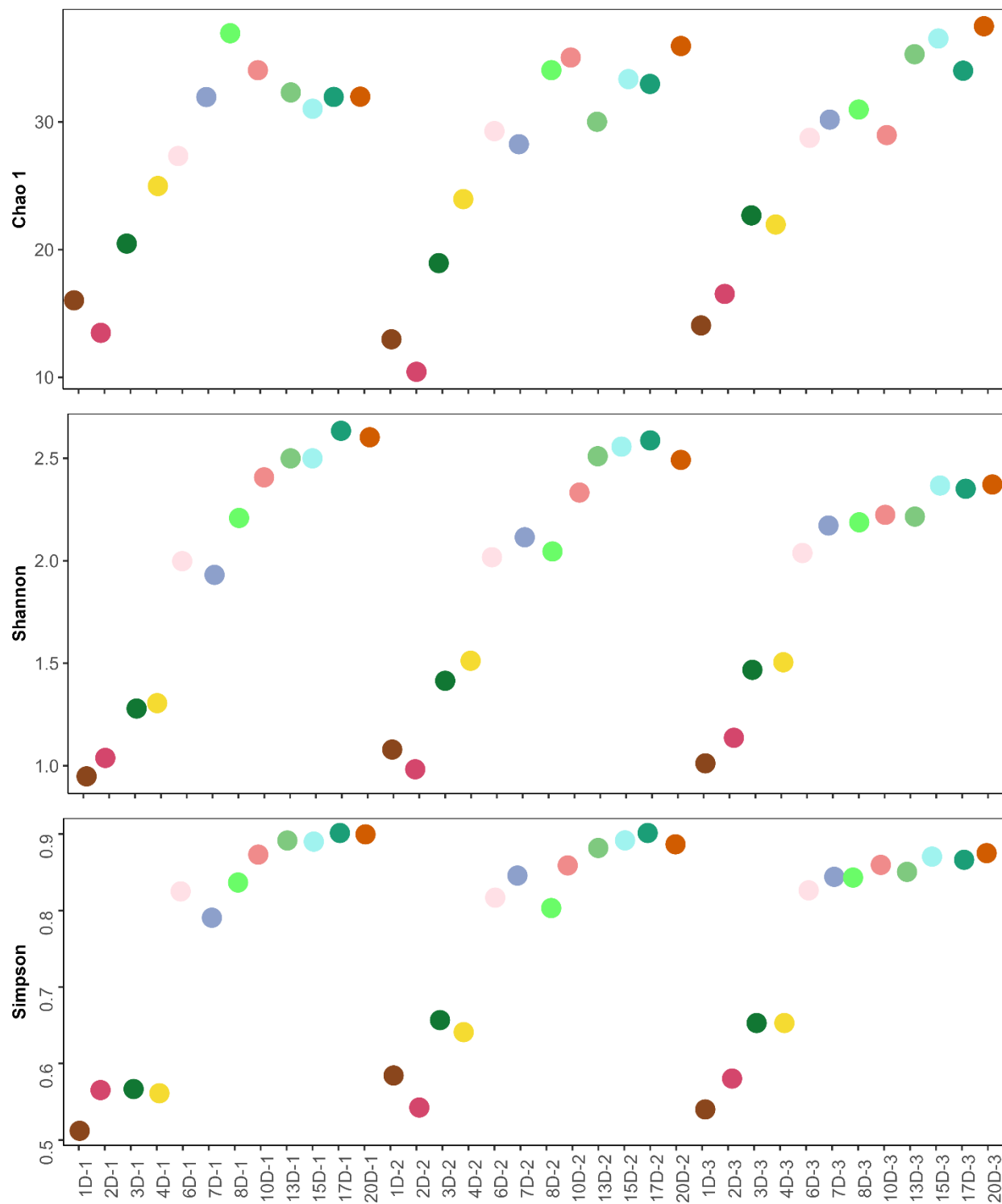
Prilog 11. Korelacijska analiza na bazi Pearson koeficijenta na normaliziranom setu podataka analiziranih fizikalno-kemijskih parametara tijekom Pokusa 3 biološke obrade procjedne vode biootpada s dodatkom mješavine egzogenih kultura lokaliteta AVD.



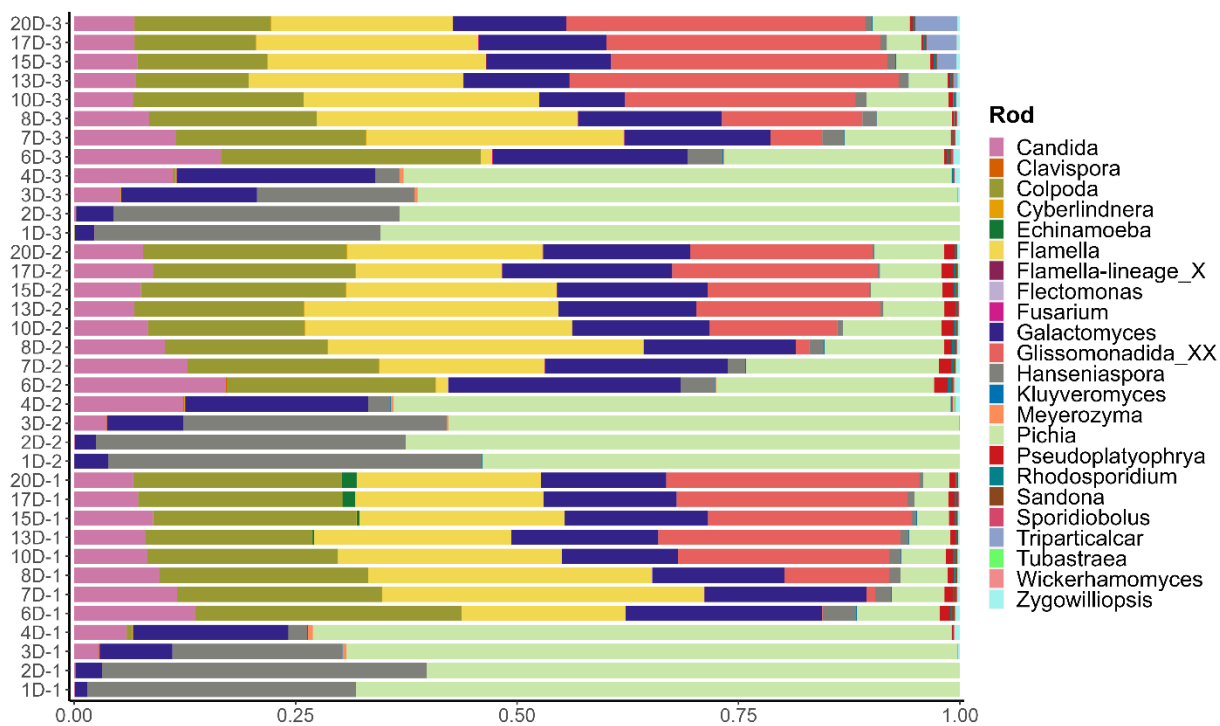
Prilog 12. Indeksi alfa raznolikosti mikrobnih prokariota (gornji graf: brojnost vrsta (Chao1); srednji graf: Shannon indeks raznolikosti; donji graf: Simpson indeks raznolikosti) po danima uzorkovanja u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada.



Prilog 13. Relativna zastupljenost mikrobne zajednice prokariota na razini roda identificiranih u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada. Oznake 1D – 20 D predstavljaju dane uzorkovanja po pokusima – 1 – Pokus 1 (kontrola), 2 – Pokus 2 (mješavina egzogenih kultura lokaliteta KRE), 3 – Pokus 3 (mješavina egzogenih kultura lokaliteta AVD). Distribucija vrsta je procijenjena prosječnom relativnom brojnošću većom od 1 % prilikom čega su ostali mikroorganizmi s relativnom brojnošću manjom od 1 % klasificirani kao „Ostatak/Others“.



Prilog 14. Indeksi alfa raznolikosti mikrobnih eukariota (gornji graf: brojnost vrsta (Chao1); srednji graf: Shannon indeks raznolikosti; donji graf: Simpson indeks raznolikosti) po danima uzorkovanja u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada.



Prilog 15. Relativna zastupljenost mikrobne zajednice eukariota na razini roda identificiranih u pokusu biološke obrade procjedne vode biootpada. Oznake 1D – 20 D predstavljaju dane uzorkovanja po pokusima – 1 – Pokus 1 (kontrola), 2 – Pokus 2 (mješavina egzogenih kultura lokaliteta KRE), 3 – Pokus 3 (mješavina egzogenih kultura lokaliteta AVD).

9. ŽIVOTOPIS

Maja Mitrović rođena je 11. prosinca 1994. godine u Virovitici. Nakon završene Opće gimnazije u Srednjoj školi Pakrac, 2013. godine upisala je preddiplomski studij biologije, a 2017. godine diplomski studij biologije (studijski smjer: znanstveni) na Odjelu za biologiju, Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku. Diplomirala je 2019. godine s diplomskim radom pod naslovom „Trzalci (Chironomidae, Diptera) u zajednici makrozoobentosa umjetnih vodenih tijela“. Iste godine upisuje Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam (studijski smjer: Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu. Od prosinca 2019. godine zaposlena je na suradničko radno mjesto asistenta u Laboratoriju za procese taloženja, Zavoda za kemiju materijala, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, na projektu znanstvene suradnje s hrvatskim znanstvenicima u dijaspori „Višefazni pristup za dešifriranje mikrobne ekologije i biotehnološkog potencijala geotermalnih izvora u Hrvatskoj“ u sklopu kojeg izrađuje svoju disertaciju, a od siječnja 2023. godine na projektu „Mikrobna ekologija jezerskih ekosustava – novi pristup“. Koautorica je na 2 znanstvena rada iz znanstvenog područja doktorskog rada koje citira WoSCC te 17 sažetaka u zbornicima skupova. Sudjelovala je na više međunarodnih i domaćih konferencija te bila dijelom 3 znanstvena projekta. Osim u znanstveno-istraživačkom radu, za vrijeme izrade doktorske disertacije, izvršavala je dužnosti neposrednog voditelja nekoliko diplomskih radova, održavala je radionice o molekularnim metodama u mikrobnoj ekologiji studentima prirodoslovnih usmjerenja te je sudjelovala u popularizaciji znanosti kao mentor u STEM Games-ima (2021., 2022.) te predavač tijekom Dana otvorenih vrata IRB (2022). U tri navrata, a ukupno 8 mjeseci, boravila je na suradničkom Odjelu za mikrobnu ekologiju, Sveučilišta u Beču, gdje je izradila jedan dio svog doktorskog rada i usavršila metode kultivacije bakterija, arheja i protista. Članica je Hrvatskog mikrobiološkog društva (HMD), Saveza mikrobioloških društava Europe (FEMS) i Alumni BiolOs udruge.

9.1. Popis objavljenih znanstvenih radova

Kostešić, E., **Mitrović, M.**, Kajan, K., Marković, T., Hausmann, B., Orlić, S., Pjevac, P. (2023) Microbial diversity and activity of biofilms from geothermal springs in Croatia. *Microbial ecology*. doi:10.1007/s00248-023-02239-1.

Mitrović, M., Kostešić, E., Marković, T., Selak, L., Hausmann, B., Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Microbial community composition and hydrochemistry of underexplored geothermal waters in Croatia. *Systematic and applied microbiology*, 45, 6; 126359, 11. doi:10.1016/j.syapm.2022.126359.

9.2. Popis sažetaka u zbornicima skupova

1. **Mitrović, M.**, Selak, L., Marković, T., Orlić, S. (2023) Geotermalne vode Hrvatske: Neistraženi biotehnološki resurs eukariotskih mikroorganizama. Knjiga sažetaka Dana doktorata biotehničkog područja 2023, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, str. 121-123.

2. **Mitrović, M.**, Kostešić, E., Marković, T., Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Iskorištavanje korisnih mikroorganizama - Prvi uvid u mikrobni svijet voda zagrebačkog geotermalnog vodonosnika. Knjiga sažetaka Dana doktorata biotehničkog područja 2022, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, str. 40-41.

3. Kostešić, E., **Mitrović, M.**, Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Vizualizacija promjena aktivnosti mikrobnih zajednica u geotermalnom biofilmu iz Bizovačkih toplica. Knjiga sažetaka Dana doktorata biotehničkog područja 2022, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, str. 124-125.

4. Kostešić, E., **Mitrović, M.**, Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Visualization and identification of metabolically active microbial populations in hot spring biofilm. 13th International Congress on Extremophiles 2022 Loutraki, Greece.

5. **Mitrović, M.**, Kostešić, E., Selak, L., Marković, T., Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Nitrifier diversity in geothermal springs - who likes it hot? 13th International Congress on Extremophiles 2022 Loutraki, Greece, 160-160.

6. Kostešić, E., **Mitrović, M.**, Pjevac, P., Orlić S. (2022) Altered activity levels of hot spring biofilms in response to the addition of different substrates. 18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18) Lausanne, Švicarska.
7. Selak, L., Marković, T., Čačković, A., **Mitrović, M.**, Orlić, S. (2022) Sun is shining, salinity is rising, are microbes responding? 18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18) Lausanne, Švicarska.
8. **Mitrović, M.**, Kostešić, E., Selak, L., Marković, T., Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Microbial diversity of Croatian thermal waters. 18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18) Lausanne, Switzerland.
9. Čačković, A., Selak, L., Kajan, K., **Mitrović, M.**, Marković, T., Brozinčević, A., Pjevac, P., Orlić, S. (2022) The spatial-seasonal differences of microbial communities in the freshwater network ecosystem. 18th International Symposium on Microbial Ecology Lausanne, Switzerland.
10. Kostešić, E., **Mitrović, M.**, Pjevac, P., Orlić, S. (2022) The influence of light on translational activity of hot spring biofilm. FEMS Conference on Microbiology : Abstract book Beograd, Srbija.
11. **Mitrović, M.**, Kostešić, E., Selak, L., Marković, T., Pjevac, P., Orlić, S. (2022) Uncovering the microbial communities in geothermal springs of Daruvarske Toplice (Croatia). FEMS Conference on Microbiology, Belgrade.
12. Čačković, A., Kajan, K., **Mitrović, M.**, Selak, L., Brozinčević, A., Orlić, S. (2022) Bacterial diversity of Plitvice Lakes catchment area during the summer season. FEMS Conference on Microbiology Belgrade.
13. Čačković, A., Kajan, K., **Mitrović, M.**, Selak, L., Brozinčević, A., Orlić, S. (2022) Seasonal changes of microbial community in Plitvice Lakes. 6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = 6th Faculty of Science PhD student symposium : book of abstracts, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, str. 256-257.
14. **Mitrović, M.**, Kostešić, E., Marković, T., Pjevac, P., Orlić, S. (2020) Biotehnoški značajna bakterija *Nitrospira* u geotermalnim izvorima Republike Hrvatske. Dan doktorata biotehničkog područja 2020, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, str. 54-55.

15. Ergović, V., Koh, M., Turković Čakalić, I., Kovačević, J., Bučanović, T., Vlaičević, B., Šag, M., **Mitrović, M.**, Kresonja, M., Čerba, D., Mihaljević, Z. (2019) Macrozoobenthos community in fast flowing streams of Slavonian mountains. Book of Abstracts, 3rd Symposium of Freshwater Biology, Zagreb: Croatian Association of Freshwater Ecologists, str. 7-7.
16. Čerba, D., Koh, M., **Mitrović, M.**, Mihaljević, Z. (2019) Chironomid assemblages in artificial and heavily modified freshwater ecosystems. Book of Abstracts, 3rd Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research, Łódź, Poljska, str. 94-94.
17. **Mitrović, M.**, Koh, M., Turković Čakalić, I., Čerba, D. (2018) Zajednica trzalaca (Chironomidae, Diptera) u sedimentu umjetnih vodenih tijela. 1. međunarodna studentska Green konferencija: knjiga sažetaka, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Prehrambeno-tehnološki fakultet, str. 15-16.