

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mirjana B. Beribaka

**UTICAJ POVIŠENE KONCENTRACIJE OLOVA
NA PROMJENE U SASTAVU MIKROBIOTE I
OSOBINE ŽIVOTNE ISTORIJE KOD
Drosophila melanogaster I *Drosophila
subobscura***

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mirjana B. Beribaka

**INFLUENCE OF INCREASED LEAD
CONCENTRATION ON CHANGES IN
MICROBIOTA COMPOSITION AND LIFE
HISTORY TRAITS IN
Drosophila melanogaster AND *Drosophila
subobscura***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTOR:

dr Marina Stamenković-Radak, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

- 1. dr Mihailo Jelić, vanredni profesor**
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

- 2. dr Marija Tanasković, naučni saradnik**
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

- 3. dr Aleksandra Patenković, naučni saradnik**
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

- 4. dr Slaviša Stanković, redovni profesor**
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru Katedre za genetiku i evoluciju Univerziteta u Beogradu - Biološki fakultet, na Odjeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu i Laboratoriji za biologiju i mikrobiologiju, Tehnološki fakultet Zvornik, Univerzitet u Istočnom Sarajevu, Republika Srpska (BiH).

Rezultati istraživanja predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji realizovani su u okviru nekoliko projekata: Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Dinamika genofonda, genetička i fenotipska varijabilnost populacija u promenljivim uslovima sredine“ pod rukovodstvom akademika Marka Anđelkovića (ev. br. 173012), Srpske akademije nauka i umetnosti „Uticaj povišene koncentracije teških metala u životnoj sredini na genetičku strukturu i adaptivne procese prirodnih populacija organizama (TEMEGENS)“, 2019-2021, pod rukovodstvom akademika Marka Anđelkovića i Ministarstva za naučnotehnološki razvoj, visoko obrazovanje i informaciono društvo Republike Srpske „Uticaj zagađenja teškim metalima na mikrobiotu vrsta roda Drosophila“, pod rukovodstvom akademika Nova Pržulja (ev. br. 19/6-020/961-104/18).

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem svojoj mentorki, prof. dr Marini Stamenković-Radak, na izuzetnoj pomoći i podršci tokom svih faza izrade ove doktorske disertacije, na razumijevanju, strpljenju i trudu, na nesebičnom dijeljenju znanja i iskustava, na svim dobronamjernim kritikama i savjetima koji su dali dodatnu vrijednost ovoj disertaciji, ali i mom budućem ličnom i profesionalnom usavršavanju.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Mihailu Jeliću na pomoći i podršci pri izvođenju eksperimentalnog dijela i analizi rezultata ove doktorske disertacije, na svim praktičnim savjetima, motivaciji i uvažavanju mišljenja, na posvećenom vremenu i trudu.

Zahvalnost dugujem dr Mariji Tanasković na uvijek korisnim savjetima pri planiranju eksperimenata i analizi dobijenih rezultata, na trudu i dobronamjernim sugestijama prilikom pisanja ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Aleksandri Patenković na svim dobronamjernim komentarima i motivaciji tokom pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se doc. dr Mariji Savić-Veselinović sa Katedre za genetiku i evoluciju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta i svim kolegama sa Odjeljenja za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, posebno Katarini Erić, Pavlu Eriću i Mini Rakić, na izuzetnoj pomoći i podršci prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvalnost dugujem akademiku Marku Anđelkoviću, koji nažalost nije doživio završetak ove doktorske disertacije, ali je svakako bila velika čast poznavati ga i saradivati sa njim.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Milanu Dragičeviću sa Odjeljenja za fiziologiju biljaka na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, na velikoj pomoći pri bioinformatičkoj analizi podataka.

Zahvalnost dugujem prof. dr Slaviši Stankoviću, dr Olji Stanojević i saradnicima sa Katedre za mikrobiologiju, kao i dr Ivici Dimkiću sa Katedre za biohemiju i molekularnu biologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta na pomoći pri analizi uzoraka i rezultata dobijenih metodom zasnovanom na kulturi bakterija.

Dr Stevanu Blagojeviću i saradnicima sa Instituta za opštu i fizičku hemiju iz Beograda dugujem zahvalnost na pomoći pri analizi sadržaja olova i drugih makro- i mikroelemenata u uzorcima.

Zahvalnost dugujem i svim svojim prijateljima i mnogim dragim ljudima koji su bili izuzetno gostoljubivi prilikom mojih boravaka u Beogradu.

Na kraju, zahvaljujem se svojoj porodici, posebno svojoj majci Mileni i sestri Branki, na svakoj vrsti podrške i motivacije, na toplim riječima, na brizi i razumijevanju bez kojih ne bih bila ovdje gdje jesam danas.

Mama, Branka, ovu disertaciju posvećujem vama.

Uticaj povišene koncentracije olova na promjene u sastavu mikrobiote i osobine životne istorije kod *Drosophila melanogaster* i *Drosophila subobscura*

Sažetak

Mikrobiota višćelijskih organizama je predstavljena raznovrsnom zajednicom mikroorganizama koji imaju uticaj na brojne osobine domaćina i u interakciji su sa promjenama sredine. Poremećaji u ravnoteži između mikrobiote i domaćina mogu dovesti do smanjenja adaptivne vrijednosti, što implicira da je održavanje homeostaze mikrobiote važan aspekt biologije domaćina. Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi diverzitet mikrobiote vrsta *Drosophila melanogaster* i *Drosophila subobscura* sa različitih staništa iz prirode i u laboratorijskim uslovima na standardnom i olovnom supstratu, te da se ispita korelacija promjena u sastavu mikrobiote sa osobinama životne istorije. Sastav mikrobiote je određen sekvenciranjem sljedeće generacije V3-V4 regiona bakterijskog gena za 16S rRNK. Dobijeni rezultati ukazuju na to da standardni supstrat gajenja kod obje vrste dovodi do smanjenja diverziteta mikrobiote u odnosu na prirodnu populaciju. Izloženost povišenim koncentracijama olova je dovela do smanjenja diverziteta mikrobiote, pri čemu je *D. subobscura* pokazala značajnije promjene u odnosu na *D. melanogaster*. U mikrobioti *D. subobscura* je identifikovan bakterijski rod *Komagataeibacter*, čija velika zastupljenost na supstratu sa olovom ukazuje na to da bi ovaj rod mogao biti značajan u prevazilaženju stresa iz životne sredine, kao i da postoji kontrola sastava mikrobiote od strane domaćina. Značajne razlike u preživljavanju od jaja do adulta su uočene kod *D. melanogaster* u pogledu sastava supstrata i porijekla populacije, dok je dužina razvića značajno varirala kod *D. subobscura* u pogledu porijekla populacija. Razlike među polovima u dužini razvića su uočene kod *D. melanogaster* na olovnom supstratu, što implicira da uticaj pojedinih faktora na osobine životne istorije može biti specifičan za vrstu.

Ključne riječi: *Drosophila melanogaster*, *Drosophila subobscura*, mikrobiota, izloženost olovo-acetatu, preživljavanje od jaja do adulta, dužina razvića

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

Influence of increased lead concentration on changes in microbiota composition and life history traits in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila subobscura*

Abstract

Microbiota of multicellular organisms is represented by a diverse community of microorganisms that have an impact on numerous host traits and interact with environmental changes. Disturbances in the balance between the microbiota and the host can lead to a decrease in adaptive value, which implies that maintaining microbiota homeostasis is an important aspect of host biology. The aim of this study was to determine the diversity of microbiota of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila subobscura* from different habitats, nature and laboratory conditions, on the standard and the lead substrate, and to examine the correlation between the changes in microbiota composition and life history traits. The composition of microbiota was determined by next-generation sequencing of the V3-V4 regions of the 16S rRNA gene. The obtained results indicate that rearing on the standard substrate in both species leads to a decrease in the diversity of the microbiota compared to the natural population. Exposure to increased lead concentrations led to a decrease in microbiota diversity, with *D. subobscura* showing more significant changes compared to *D. melanogaster*. The bacterial genus *Komagataeibacter* was identified in the *D. subobscura*'s microbiota, whose high prevalence on the lead substrate indicates that this genus could be important in overcoming environmental stress, and that the microbiota composition is controlled by the host. Significant differences in egg-to-adult viability were observed in *D. melanogaster* in terms of substrate composition and population origin, while developmental time varied significantly in *D. subobscura* in terms of population origin. Sex differences in developmental time were observed in *D. melanogaster* on the lead substrate, implying that the influence of individual factors on life history traits may be species-specific.

Key words: *Drosophila melanogaster*, *Drosophila subobscura*, microbiota, lead-acetate exposure, egg-to-adult viability, developmental time

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Biotički i abiotički faktori životne sredine.....	1
1.2. Promjene faktora u životnoj sredini i njihove međusobne interakcije	2
1.2.1. Adaptacije na promjene sredine i genotipsko-sredinske interakcije	3
1.2.2. Osobine životne istorije.....	7
1.3. Mikrobiota - pojam, značaj u adaptaciji i interakciji sa promjenom sredine	9
1.3.1. Diverzitet mikrobiote	13
1.3.2. Mikrobiota kičmenjaka i čovjeka	15
1.3.3. Mikrobiota insekata	18
1.3.4. Mikrobiota vrsta roda <i>Drosophila</i>	20
1.4. Teški metali kao abiotička komponenta životne sredine	22
1.4.1. Uticaj teških metala na populacije i jedinke različitih vrsta.....	23
2. Ciljevi istraživanja	27
3. Materijal i metode	28
3.1. Vrste i lokalitet.....	28
3.2. Opšti uslovi održavanja.....	29
3.3. Poređenje sastava mikrobiote između prirodnih i laboratorijskih populacija	30
3.4. Utvrđivanje sastava mikrobiote kod <i>D. melanogaster</i> i <i>D. subobscura</i> metodom zasnovanom na kulturi bakterija.....	31
3.4.1. Kultivacija i izolacija bakterija.....	31
3.4.2. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata.....	31
3.5. Poređenje sastava mikrobiote kod jedinki uzgajanih u laboratoriji i na supstratu sa teškim metalima.....	32
3.6. Ispitivanje uticaja sastava mikrobiote i prisustva teških metala na osobine životne istorije	32
3.7. Određivanje sadržaja olova i drugih makro- i mikroelemenata ICP-OES metodom	33
3.8. Izolacija DNK i metagenomska analiza	34

3.9.	Sastav mikrobiote i taksonomska analiza.....	37
3.10.	Alfa diverzitet	37
3.11.	Beta diverzitet	38
3.12.	Ispitivanje osobina životne istorije	39
3.12.1.	Statistička analiza osobina životne istorije.....	39
4.	Rezultati.....	40
4.1.	Taksonomska zastupljenost bakterijskih zajednica gajenih u kulturi.....	40
4.2.	Taksonomska zastupljenost bakterijskih zajednica dobijenih metagenomskom analizom	43
4.3.	Alfa diverzitet.....	52
4.4.	Beta diverzitet.....	55
4.5.	Sadržaj olova i drugih makro- i mikroelemenata u uzorcima	61
4.6.	Osobine životne istorije	62
5.	Diskusija.....	66
6.	Zaključci.....	74
7.	Literatura.....	76
8.	Prilozi.....	98

1. Uvod

Razumijevanje mehanizama i procesa pomoću kojih se organizmi prilagođavaju životnoj sredini je centralni problem istraživanja u evolucionoj i, posebno sa aspekta primjene, u konzervacionoj biologiji. Pod različitim selekcionim pritiscima, ili demografskim faktorima, promjene u evolucionom potencijalu za očuvanje vrsta i populacija zavise od interakcija, kako među članovima ekosistema, tako i sa svim biotičkim i abiotičkim činiocima životne sredine. Klimatske promjene i antropogeni uticaj na životnu sredinu oblikuju prostorne i vremenske obrasce promjena, kako u genetičkoj, tako i u fenotipskoj strukturi vrsta i populacija.

Pošto insekti imaju fundamentalnu ulogu u većini ekosistema, kontinuirane ili nagle (stresne) promjene u životnoj sredini utiču na njihove populacije i ostavljaju posljedice na cijeli ekosistem (Scudder, 2017). Tako, brojne vrste insekata mogu biti dobri indikatori promjena sredine, kako na lokalnoj, tako i globalnoj skali.

U ovom radu je ispitivan uticaj jednog abiotičkog faktora (povišena koncentracija olova) i jednog biotičkog faktora (simbioza sa mikrobiotom) na osobine životne istorije kod domaćina, dvije vrste insekata istog roda, *Drosophila*, koje su prisutne u brojnim staništima koja okružuju čovjeka. Olovo je sveprisutno u životnoj sredini i raste mu zastupljenost, a ima značajan uticaja na rast, razvoj i opstanak organizama, dok je mikrobiota organizama značajna u prilagođavanju na promjenljive uslove životne sredine.

1.1. Biotički i abiotički faktori životne sredine

Životnu sredinu jedinke čine svi faktori spoljašnje sredine koji mogu na različite načine da utiču na nju i na njenu egzistenciju. U odnosu na svoju prirodu, ti faktori mogu da se podijele na abiotičke i biotičke. U abiotičke faktore se ubrajaju fizičko-hemijski činioci, kao što su klimatski (temperatura, svjetlost, vlažnost, vazдушna kretanja), osobine zemljišta, reljefa i nutritijenti. Međutim, svaka jedinka u prirodi stupa u interakcije i sa drugim vrstama iz okruženja, od kojih takođe može da zavisi njen opstanak. Te interakcije su uslovljene biotičkim faktorima životne sredine i u njih se ubrajaju sve žive komponente ekosistema, od mikroorganizama, virusa, do eukariota, a najčešći tipovi interakcija su parazit-domaćin, predator-plijen, simbioza ili kompeticija (Stanković, 1962).

Mikrobiota različitih vrsta, kao jedan od važnih biotičkih faktora koji utiče na osobine adaptacije i osobine životne istorije, sve češće je fokus istraživanja. Odnos domaćin-mikrobiota je jedan od najčešćih simbiotskih odnosa u životinjskom i biljnom svijetu, pri čemu uglavnom nije obligatoran već je mutualistički. Pored toga, mikrobiota često dolazi u interakciju sa domaćinom i utiče na njegovu adaptivnu vrijednost u promjenljivim abiotičkim faktorima životne sredine (Gould i sar., 2018). Mikrobiota digestivnog trakta kod nekih vrsta predstavlja veoma redukovanu grupu bakterijskih zajednica koje mogu da se nađu u okruženju domaćina, što sugeriše da domaćin ima određeni nivo kontrole nad bakterijama koje nastanjuju njegov digestivni trakt (Chandler i sar., 2011; Wang i sar., 2019).

Kada se radi o faktorima koji oblikuju mikrobiološku zajednicu domaćina, neka istraživanja su pokazala da faktori spoljašnje sredine imaju dominantnu ulogu u oblikovanju mikrobioloških zajednica povezanih sa domaćinom (Moghadam i sar., 2018); međutim,

postoje i istraživanja koja daju prednost genetičkoj osnovi domaćina kao glavnom faktoru u oblikovanju mikrobiote (Dobson i sar., 2015). Pored navedenog, ishrana se pokazala kao važan faktor koji utiče na diverzitet i bogatstvo mikrobiote (Erkosar i sar., 2018), a značajnu ulogu imaju i pol i starost jedinki. Usljed razlika u selekcionim pritiscima, mikrobiološke zajednice organizama su specifične za domaćine iz različitih populacija i imaju važnu ulogu u odbrani od parazita. Određeni razvojni stadijumi domaćina sa svojom mikrobiotom uspostavljaju mutualizam koji može da bude fakultativan ili stabilan odnos specifičan za vrstu i populaciju (Ramalho i sar., 2017; Koskinioti i sar., 2019; Malacrinò, 2022). Istraživanja su pokazala da promjene u sastavu mikrobiote mogu da utiču na dužinu trajanja života domaćina (Clark i sar., 2015), ali i da efekat promjena u nekim slučajevima zavisi od razvojnog stadijuma domaćina. Pored navedenog, mikrobiota utiče na metabolizam domaćina, ponašanje, sposobnost adaptacije, imunski odgovor, i druge osobine koje imaju direktan uticaj na adaptivnu vrijednost (Habineza i sar., 2019; Ma i sar., 2021).

Teški metali su prirodno prisutni u životnoj sredini, ali su zbog različitih antropogenih i prirodnih aktivnosti postali visoko zastupljeni u vodi, vazduhu i zemljištu i postali su jedan od najvećih globalnih problema. Oni su podjednako toksični i za biljke i za životinje jer većina njih nema nikakvu funkcionalnu ulogu u organizmu. Nakon ulaska u organizam, većina teških metala se tamo akumulira duže vrijeme, remeteći homeostazu i stvarajući različite negativne efekte na tkiva, organe i organizam u cjelini. Poremećaji koje izazivaju teški metali u velikoj mjeri zavise od njihove doze, vremena izlaganja i koncentracije. Bioakumulacija teških metala dovodi do različitih toksičnih efekata na tkiva i organe tako što ometa ćelijske funkcije uključujući rast, proliferaciju, diferencijaciju, mehanizme popravke oštećenja i apoptozu. Većina teških metala ima sličan mehanizam djelovanja na različite organizme. Naime, oni uglavnom indukuju toksičnost stvaranjem slobodnih radikala, slabljenjem antioksidativne odbrane organizma, inaktivacijom pojedinih enzima i izazivanjem oksidativnog stresa (Balali-Mood i sar., 2021).

1.2. Promjene faktora u životnoj sredini i njihove međusobne interakcije

Mali je broj sredina, ako uopšte postoje, koje su stabilne i bez uticaja faktora koji remete homeostazu i ugrožavaju opstanak vrsta koje u njima žive. Stresni faktori životne sredine mogu da ograniče produktivnost, reproduktivni uspjeh i razvoj bioloških sistema. U određenoj mjeri, stresni faktori utiču na sve organizme, kao i na njihove populacije, zajednice i ekosisteme. Stresni faktori mogu biti prirodnog porijekla, kao što su: kompeticija, predatorstvo, parazitizam i druge interakcije među organizmima, zatim klimatske promjene, promjene u sastavu ili količini hranljivih materija, variranje u vlažnosti vazduha, i slično. Međutim, stresni faktori povezani sa ljudskim aktivnostima su sve pristupniji u biosferi i utiču na sve nivoe biološke organizacije. U velikom broju slučajeva, antropogeni faktori nanose značajnu štetu resursima koji su potrebni za održavanje biodiverziteta i ekosistema (Freedman, 2018).

Pored toga, organizmi se rijetko suočavaju sa samo jednim stresnim faktorom već je to najčešće veći broj faktora koji zajedno deluju u isto vrijeme (Hopkins i sar., 2017). U takvim sredinama postoji potencijal da višestruki stresni faktori utiču jedni na druge na složene

načine (Maher i sar., 2019; Carrier-Belleau i sar., 2021; Ferguson i sar., 2021). Stresni faktori mogu da budu u različitim interakcijama, i to sinergističkim ili antagonističkim. Interakcije stresnih faktora se određuju u odnosu na nulti model koji predviđa zajedničko djelovanje faktora bez međusobnih interakcija, odnosno da faktori djeluju nezavisno. Sinergističke interakcije se javljaju kada je kombinovani efekat dva ili više faktora veći od zbira pojedinačnih faktora. Nasuprot tome, kada kombinovani efekat višestrukih faktora dovodi do manjeg odgovora od onog koji je predviđen nultim modelom, interakcija se smatra antagonističkom (Piggott i sar., 2015). Ako zajednički efekat faktora odstupa (više od prihvatljive granice) od nultog modela kao rezultat antagonističkih ili sinergističkih interakcija između faktora, za pouzdano predviđanje njihovog efekta mogu biti potrebni složeniji modeli koji uzimaju u obzir interakcije više faktora (Thompson, MacLennan, & Vajnbruk, 2018).

Razlikovanje klasa potencijalnih interakcija među stresnim faktorima je važno, jer usmjerava pažnju na mehanizme za koje je vjerovatno da će proizvesti specifične tipove efekata, i razdvaja efekte na osnovu težine. U tu svrhu, Folt i sar. (1999) su podijelili efekte višestrukih stresnih faktora na tri modela i to: jednostavni komparativni efekti, aditivni efekti i multiplikativni efekti. Model komparativnih efekata pretpostavlja da je efekat stresnih faktora u kombinaciji, jednak efektu najvećeg ili dominantnog faktora. Ovo je najjednostavniji od tri modela i opisuje situacije u kojima jedan faktor ima prednost nad drugim ili nad više faktora. U okviru modela aditivnih efekata, sinergizam ili antagonizam se javlja kada je kombinovani efekat višestrukih stresnih faktora veći (sinergizam) ili manji (antagonizam) od zbira efekata koje izazivaju pojedinačni faktori. I treći model, model multiplikativnih efekata, je primjenljiv u situacijama kada se stresnim faktorom iz jednog izvora može dalje potencijalno upravljati drugim izvorima stresa. Na primjer, ako je kombinovani odgovor dva faktora pozitivniji od očekivanog aditivnog efekta, to bi se smatralo pozitivnim sinergističkim efektom. Nasuprot tome, ako je kombinovani odgovor negativniji od očekivanog aditivnog efekta, to bi se smatralo negativnim sinergističkim efektom. Ista logika važi i za antagonističke interakcije (Carrier-Belleau i sar., 2021). Sa stanovišta konzervacije, određivanje modela interakcija stresnih faktora je od velike važnosti pri identifikaciji specifičnih odgovora na stresore koji često zahtjevaju različite pristupe. Razlučivanje odgovora na interakcije među stresorima, koji mogu biti korisni ili štetni, je od suštinskog značaja budući da i sinergistički i antagonistički efekti mogu da imaju štetne i korisne efekte, u zavisnosti od izvora stresora i pravca njegovog uticaja (Côté i sar., 2016).

1.2.1. Adaptacije na promjene sredine i genotipsko-sredinske interakcije

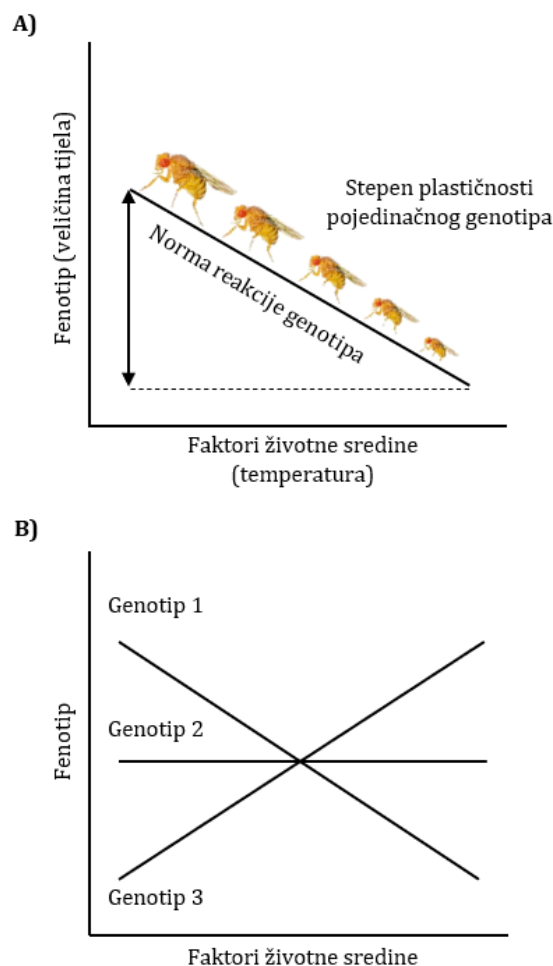
Odgovor populacija na stresne faktore iz spoljašnje sredine može da varira zbog različitih evolucionih istorija izloženosti određenim stresnim faktorima (Schoville i sar., 2012; Gonzalez i Bell, 2013), a značaj evolucionih procesa, uključujući lokalnu adaptaciju, u ovom kontekstu dobija na značaju (Schulte, 2007; Rogell i sar., 2009; Kimberly i Salice, 2015). Kroz promjene u biotičkim i abiotičkim faktorima u životnoj sredini, prirodna selekcija djeluje na fenotipsku varijabilnost prisutnu u populacijama. Određena nasljedna osobina može povećati adaptivnu vrijednost u novom okruženju jer jedinke sa takvom osobinom ostavljaju više potomstva. Kao

posljedica toga, povećava se učestalost date osobine u populaciji, a time i učestalost alela koji doprinose tom fenotipu. Alternativno gledište je da sami stresni uslovi mogu nekako pokrenuti evolucione promjene. Ekstremni uslovi mogu uticati i na ekspresiju fenotipske varijabilnosti i na stepen do kojeg je ona genetički određena. Waddington (1953) je predložio da ekstremni uslovi mogu dovesti do poremećaja normalnog razvoja, što dovodi do pojave osobina koje nisu prisutne kada se organizmi razvijaju u normalnim uslovima. Formiranje takvih novih varijanti bi moglo da obezbijedi izvor varijabilnosti na koju prirodna selekcija može da djeluje. Međutim, ekstremni uslovi koji se koriste za generisanje ovih mutantnih fenotipova nisu prisutni u prirodi ili traju jako kratko. Ipak, ova saznanja nameću pitanje da li uslovi životne sredine igraju značajniju ulogu u određivanju evolucije nekih osobina, kao što su osobine životne istorije, fiziološke i osobine vezane za veličinu tijela. Možda velike evolucione promjene u ovim osobinama zahtijevaju nove fenotipske promjene koje se dešavaju samo kada je okruženje stresno. Čini se da je ispoljavanje mnogih osobina životne istorije zaštićeno od manjih promjena u uslovima životne sredine, posebno kada su te osobine blisko povezane sa fitnessom. Stresni uslovi u prirodi mogu poboljšati ekspresiju genetičke varijabilnosti u takvim osobinama, omogućavajući im da brže evoluiraju (Jenkins i sar., 2013). Ispitivanje genetičke varijabilnosti je ključno za predviđanje budućih odgovora populacije na promjene u životnoj sredini jer bi moglo omogućiti populaciji da se prilagodi tim promjenama *in situ* (Hoffmann i Sgrò, 2011; Carroll i sar., 2014).

Kontinuirano praćenje prirodnih populacija nekih životinjskih vrsta tokom dužeg vremenskog perioda otkriva da većina populacija proživljava kontinualno ili sporadično stresne uslove usljed promjena u životnoj sredini, koje traju nekoliko ili više generacija. Tada, osim selekcionih pritisaka kojima su izložene, do izražaja mogu doći i demografski faktori koji uslovljavaju slučajne promjene i smanjenje genetičke varijabilnosti. Stresni uslovi u prirodi mogu nastati usljed direktnih efekata iznenadnih klimatskih promjena, kao što su procesi suše ili poplava, ili efekti ekstremno toplih ili hladnih temperatura. Ove promjene životne sredine mogu imati i mnoge indirektno efekte, utičući na kompetitivne interakcije, interakcije predatora i plijena, interakcije sa mikroorganizmima, podložnost bolestima. Organizmi koji žive u promjenljivim sredinama posjeduju mehanizme koji im obezbjeđuju aklimatizaciju i/ili adaptaciju na promjene. Neke vrste migriraju na velike udaljenosti da bi izbjegle sezonske ekstremne uslove, druge izbjegavaju ekstremni stres ulazeći u neaktivnu fazu, kao u slučaju hibernacije kod sisara i dijapauze kod insekata. Osim toga, pojedine vrste su razvile mehanizme za suočavanje sa iznenadnim promjenama kao što su na primjer, brze promjene na ćelijskom nivou koje uključuju sintezu enzima i proteina toplotnog šoka, a javljaju se kao odgovor na većinu stresnih uslova (Loeschcke i sar., 1997).

Promjene u životnoj sredini mogu dovesti do značajnih promjena u osobinama životne istorije u populacijama različitih vrsta. Determinacija fenotipske varijabilnosti osobina životne istorije je složena i one su kvantitativne, poligeno determinisane osobine (Falconer, 1996). Ispoljavanje osobina životne istorije je tijesno povezano sa varijabilnošću životne sredine, te se one analiziraju u okviru koncepta fenotipske plastičnosti (Stearns, 1992; Price i sar., 2003). Fenotipska plastičnost se opisuje kao norma reakcije genotipa, i predstavlja interakciju varijabilnosti genotipa i sredine (Slika 1). Selekcija oblikuje plastičnost komponenti životne istorije tako što djeluje na genetičku varijabilnost koja doprinosi plastičnosti. Smatra se da su norme reakcije (i stoga plastičnost) optimalne kada favorizuju

fitnes za svaku od različitih životnih sredina (Flatt i Heyland, 2011). Promjena genetičke varijabilnosti u različitim sredinama je jedan od mnogih oblika interakcije genotipa i sredine (engl. *genotype x environment interacion*, G×E). One se mogu protumačiti ili kao promjenljiva genetička osnova u različitim sredinama ili kao promjenljiva plastičnost životne sredine među genotipovima, u zavisnosti od toga koji faktor je izabran kao kontekst. G×E ima važne implikacije na kvantitativno variranje osobina i evoluciju (Huang i sar., 2020).



Slika 1. Plastičnost osobina. (A) Fenotipska plastičnost se često vizuelizuje korišćenjem norme reakcije koje povezuju fenotipove i faktore životne sredine za određeni genotip. Dat je primjer jedne norme reakcije za veličinu tijela *Drosophila*, koja povezuje promjene u temperaturi tokom razvića sa fenotipovima veličine tijela adulta, koje proizvodi isti genotip. (B) Genetička varijabilnost među genotipovima u fenotipskoj plastičnosti se manifestuje kao skup norme reakcije sa različitim nagibima. Takav obrazac se naziva interakcija genotipa i sredine (G×E), a ovdje je prikazan slučaj posebnog jakog G×E, sa normama reakcije tri genotipa koji se međusobno ukrštaju (Fabian i Flatt, 2012).

Stanje plastičnosti ili homeostaze, u odnosu na genetičke ili ekološke varijacije, nije nužno statično i može se modifikovati, i genetičkim faktorima i faktorima sredine. Klasičan primjer je sistem proteina toplotnog šoka (engl. *heat-shock proteins*, Hsp), posebno Hsp90, čija je ekspresija ekološki plastična i povećava se pod temperaturnim stresom, ali ublažava fenotipske promjene izazvane mutacijama, da bi se održala homeostaza. Ovakav proces se naziva kanalizacija (Waddington, 1942; Rutherford i Lindquist, 1998). Nasuprot kanalizaciji,

dekanalizacija opisuje promjenu iz homeostatskog stanja u plastično, što omogućava fenotipsko izražavanje genetičke varijabilnosti ili varijabilnosti životne sredine.

Razumijevanje načina na koji vrste, populacije i jedinke opstaju, razvijaju se, reprodukuju i regulišu fiziološke procese, kada su suočeni sa stresnim faktorima u interakciji, je važna i prioritarna oblast istraživanja evolucione biologije. Promjene životne sredine imaju ključnu ulogu u oblikovanju obrazaca adaptacija, pri čemu se populacije mogu prilagoditi na nekoliko načina. Tako, jedinke mogu biti genetički i fenotipski različite, pri čemu različite jedinke imaju maksimalan fitness za različite uslove životne sredine, što se označava kao strategija genetičke diferencijacije. Sa druge strane, jedinke mogu biti genetički i fenotipski uniformne, tako da imaju u prosjeku visok fitness u svim sredinama, što predstavlja strategiju svestranosti (engl. *jack-of-all-trades*). I u nekim slučajevima, jedinke mogu biti genetički uniformne, ali fenotipski različite, tako da u svakom okruženju imaju optimalan fenotip, što se naziva strategijom fenotipske plastičnosti (Scheiner, 2016).

Adaptivna fenotipska plastičnost omogućava praćenje promjena životne sredine u okviru jedne ili nekoliko generacija bez genetičkih promjena (Price i sar., 2003), dok lokalna adaptacija dovodi do genetičke diferencijacije među populacijama koje su prilagođene na različita staništa (Kawecki i Ebert, 2004). Obrasci lokalne adaptacije se često otkrivaju kroz asocijaciju varijabilnosti osobina i sredine. Takve korelacije su često uočljive u širim geografskim razmjerama, na primjer, *Drosophila subobscura* pokazuje gradijent u veličini krila u odnosu na geografsku širinu. Populacije *D. subobscura*, koje su prirodno rasprostranjene širom Evrope, pokazuju relativno malu veličinu krila u južnim dijelovima rasprostranjenja (oko Sredozemnog mora), dok se veličina krila progresivno povećava prema sjevernoj granici distribucije u Njemačkoj i Danskoj (Huey i sar., 2000). Zanimljivo je da je sličan gradijent u veličini krila brzo evoluirao u populacijama *D. subobscura* u Sjevernoj Americi, gdje je ova vrsta uvedena ranih 1980. godina (Beckenbach i Prevosti, 1986). Ponavljanje sličnih korelacija koje su rezultat asocijacije varijabilnosti osobina i sredine kod različitih vrsta može biti dokaz uloge prirodne selekcije u evoluciji gradijenta fenotipova. Međutim, same korelacije između osobina i sredine nisu dovoljne da bi se zaključivalo o adaptaciji, čak ni u slučajevima kada se slični gradijenti fenotipova pojavljuju više puta duž sličnih sredina, pošto je prirodna selekcija samo jedan od mehanizama pomoću kojih se takvi gradijenti mogu javiti. Alternativno, takva ekspresija fenotipova može biti posljedica fenotipske plastičnosti, gdje jedinke u različitim populacijama ispoljavaju drugačiji fenotip zbog izloženosti različitim uslovima životne sredine, a ne zbog razlika u genima koji kontrolišu ekspresiju date osobine. Shodno tome, eksperimentalna istraživanja su pogodna u razlučivanju uticaja faktora sredine i genetičkih varijacija na fenotipske varijacije uočene među populacijama. U laboratorijskim eksperimentima su populacije iz različitih sredina izložene kontrolisanim, istim uslovima životne sredine kako bi se provjerilo da li su razlike u osobinama iz prirode zadržane i u eksperimentalnim uslovima. Ovakva istraživanja na *Drosophila melanogaster* su pokazala da variranje u veličini krila koje je uočeno među populacijama u prirodi i dalje traje u laboratoriji, što sugeriše da genetička diferencijacija i fenotipska plastičnost doprinose uočenim fenotipskim razlikama u prirodi (Zwaan i sar., 2000).

1.2.2. Osobine životne istorije

Životna istorija (engl. *life history*) obuhvata život jedinke od rođenja do smrti, opisujući obrasce sazrijevanja, reprodukcije, preživljavanja i smrti, specifičnih po uzrastu ili stadijumu. U literaturi se sintagma „osobine životne istorije“ često koristi kao sinonim za komponente adaptivne vrijednosti, tako da su mnoge fenotipske osobine sa značajnim efektima na reprodukciju i preživljavanje nazvane osobinama životne istorije (Flatt i Heyland, 2011). Za razliku od navedenih osobina životne istorije, smatra se da morfološke, fiziološke ili bihevioralne osobine doprinose fitnessu samo indirektno (Roff i Fairbairn, 2007).

Evolucija osobina životne istorije nastoji da objasni osnovne fenotipske karakteristike nekog organizma tokom njegovog životnog ciklusa i raznolikost adaptivnih strategija koje koriste različiti organizmi kako bi poboljšali svoje preživljavanje i reproduktivni uspjeh u različitim uslovima životne sredine (Roff, 1992; Stearns, 1992). Osobine životne istorije, koje opisuju osnovne obrasce rasta organizma, sazrijevanje, reprodukciju i preživljavanje, pokazuju veliku varijabilnost na nivou jedinki, populacija, vrsta. Razumijevanje izvora ove varijabilnosti je cilj istraživanja životne istorije i analitički aspekt se fokusira na variranje i interakciju različitih ključnih osobina, s obzirom da prirodna selekcija djeluje tako da povećava adaptivnu vrijednost životne istorije u cjelini (Roff, 1992; Stearns, 1992). Fitness se integriše u cjelokupnu reproduktivnu sposobnost organizma, a osobine životne istorije su glavne komponente ove integracije. Međutim, ulaganje u alternativne osobine životne istorije, a time i mogući skup kombinacija osobina, ograničeno je genetičkim, razvojnim, fiziološkim i filogenetskim karakteristikama (Flatt i Heyland, 2011).

Osobine životne istorije su podložne i evolucionim ograničenjima i prirodna selekcija ne može maksimalno da unaprijedi osobine životne istorije, a time ni fitness, izvan određenih granica (Stearns, 1992; Houle, 2001; Fabian i Flatt, 2012). Jedan od najvažnijih tipova ograničenja su kompromisi u životnoj istoriji (Roff, 1992; Stearns, 1992) kada je na primjer, povećanje jedne osobine životne istorije (i time poboljšanje fitnessa) povezano sa smanjenjem druge osobine životne istorije (i smanjenjem fitnessa). Stearns (1992) navodi 45 mogućih kompromisa među deset glavnih osobina životne istorije. Kompromisi se obično opisuju negativnim fenotipskim ili genetičkim korelacijama između komponenti fitnessa u populaciji. Ako među komponentama adaptivne vrijednosti postoji genetička korelacija, predviđa se da, ako je negativna, ograničava evoluciju uključenih osobina. Dakle, genetički kompromis postoji u situaciji kada je evolucionarna promjena u osobini koja povećava fitness, povezana sa evolucionom promjenom druge osobine koja smanjuje fitness.

Neki od najboljih dokaza za genetički zasnovane kompromise u životnoj istoriji potiču iz vještačke selekcije i evolucionih eksperimenata sprovedenih na *D. melanogaster* (Flatt i Schmidt, 2009; Flatt, 2011). Na primjer, direktna vještačka selekcija za produženi životni vijek u genetički varijabilnim laboratorijskim populacijama *D. melanogaster* izaziva evoluciju produženog životnog vijeka odraslih jedinki (ponekad za 10 generacija), ali ovo evoluciono povećanje dužine života je povezano sa smanjenom ranom reprodukcijom. Ovo sugerije da su životni vijek i rana reprodukcija genetički negativno povezani, npr. preko antagonističkih plejotropnih alela (Fabian i Flatt, 2012). Ukratko, mnogi eksperimenti su otkrili: negativnu korelaciju između ranog fekunditeta i životnog vijeka odraslih; pozitivnu korelaciju između dužine razvića i veličine tijela; pozitivnu korelaciju između dužine razvića ili veličine tijela sa

ranim fekunditetom; i negativnu korelaciju između ranog i kasnog fekunditeta (Flatt i Schmidt, 2009; Flatt, 2011). Ostala ograničenja životne istorije, koja sprečavaju prirodnu selekciju da postigne određeni optimum fitnesa, mogu uključivati biofizičke, biohemijske i strukturne faktore, razvojna svojstva organizma, filogenetske i istorijske pretpostavke, ili jednostavno nedostatak genetičke varijabilnosti (Stearns, 1992; Houle, 2001).

Zahvaljujući napretku DNK tehnologija i statističkih metoda, u genomima različitih vrsta se mogu identifikovati regioni koji su prošli prirodnu ili vještačku selekciju (Qanbari i sar., 2012). Većina studija u ovoj oblasti se zasniva na konceptu genetičkog prevoženja (engl. *hitchhiking*), koji sugerira da selekcija utiče na genom u određenom regionu, ostavljajući otisak, zapis (engl. *signature*) oko ciljnog gena, pri čemu u okolnim regionima, koji su selektivno neutralni, takođe dolazi do povećanja učestalosti ili vremenom, fiksacije alela (Smith i Haigh, 1974). Teorija genetičkog prevoženja podrazumijeva širenje novih varijanti u populaciji usljed selekcije koja favorizuje povoljne efekte na fitnes (Przeworski, 2002; Kim i Nielsen, 2004). Genetička varijabilnost koja je bila prisutna u populaciji prije procesa selekcije (varijabilnost predaka), održava se samo ako se usljed rekombinacija poremeti veza između gena na koji djeluje selekcija i blisko vezanih gena. Rezultat takvog događaja je snažno smanjenje genetičke varijabilnosti oko datog mjesta (otklon, engl. *hard sweep*), pri čemu se nova povoljna mutacija brzo širi do fiksacije (Pritchard i sar., 2010). Prema drugom scenariju, adaptivna supstitucija djeluje na više kopija povoljnog alela u populaciji, što se može dogoditi iz dva razloga. Prvo, kada adaptacija proizlazi iz postojeće genetičke varijabilnosti, mnoge kopije povoljnog alela mogu biti prisutne u populaciji, tako da fiksacija ovog alela može da se dogodi kod većeg broja potomaka u populaciji. Drugo, povoljan alel se može uvesti u populaciju ponavljanom mutacijom ili protokom gena tokom faze selekcije, gdje nekoliko potomaka nezavisnog porijekla može doprinijeti fiksaciji alela. U oba slučaja, različiti aleli u blizini bilo koje povoljne kopije će biti zadržani u populaciji, što će rezultirati različitim haplotipovima (Pennings i Hermisson, 2006). Međutim, ukoliko dođe do promjene selekcionog pritiska u određenim uslovima, može da se desi da se aleli, koji su prethodno imali neutralan ili blago štetan efekat, nađu u selektivnoj prednosti (meki otklon, engl. *soft sweep*) (Cutter i Payseur, 2013). Eksperimentalna evolucija, posebno selekcija u laboratoriji, omogućava proučavanje adaptivnih odgovora u kontrolisanom laboratorijskim uslovima (Burke i Rose, 2009; Schlötterer i sar., 2015). U takvim uslovima, veliki broj genotipova se izlaže praćenom stresoru, pri čemu se adaptivni odgovor može mjeriti kroz vrijeme u populacijama, u kombinaciji sa sekvenciranjem sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS) (Long i sar., 2015). Sa uvođenjem metoda NGS, omogućena je detekcija otisaka selekcije na nivou genoma čime je napravljen veliki korak u istraživanju evolucione istorije populacija, kako kod model organizama, tako i kod ostalih (Allendorf i sar., 2010). Dok se mnoge eksperimentalne studije evolucije oslanjaju na skraćivanje selekcije kako bi se odredili genotipovi koji doprinose sljedećoj generaciji (Hardy i sar., 2018; Gerritsma i sar., 2019), laboratorijska selekcija se zasniva na razlikama u fitnesu između genotipova nakon izlaganja višegeneracijskom selekcionom pritisku (Garland i Rose, 2009) i stoga bliže oslikava procese adaptacije i kompeticije koji se dešavaju u prirodi (Hsu i sar., 2021).

1.3. Mikrobiota - pojam, značaj u adaptaciji i interakciji sa promjenom sredine

Mikrobiota se obično definiše kao skup živih mikroorganizama prisutnih u definisanom okruženju (Marchesi i Ravel, 2015). Kako se virusi, prioni i viroidi smatraju acelularnim mikroorganizmima, oni ne pripadaju mikrobioti. Sa druge strane, termin mikrobiom, kako su ga prvobitno definisali Whipps i sar. (1988), uključuje, ne samo zajednicu mikroorganizama, već i niz molekula koje oni proizvode. To podrazumijeva njihove strukturne elemente (nukleinske kiseline, proteine, lipide, polisaharide), metabolite (signalne molekule, toksine, organske i neorganske molekule) i molekule koje proizvode koegzistirajući domaćini i koji su pod uticajem faktora životne sredine. Prema tome, virusi i ekstraćelijska DNK treba da budu uključeni u termin mikrobiom, ali oni nisu dio mikrobiote. Termin mikrobiom se takođe ponekad pogrešno koristi kao sinonim za termin metagenom. Metagenom je, međutim, jasno definisan kao skup genoma i gena članova mikrobiote (Marchesi i Ravel, 2015).

Zbog velikog uticaja mikrobiote na fitnes domaćina, uveden je koncept holobionta. Ovaj koncept pretpostavlja da holobiont (domaćin + simbionti) sa svojim hologenomom (genom domaćina + mikrobiom) funkcioniše kao jedinstvena biološka cjelina i da kao takav predstavlja jedinicu selekcije u evoluciji (Rosenberg i sar., 2007; Zilber-Rosenberg i Rosenberg, 2008). Prema Rosenberg i Zilber-Rosenberg (2014), razmatranje holobionta sa njegovim hologenomom kao podlogom za selekciju, podrazumijeva empirijske podatke i njegove ključne postavke su da svi višećelijski organizmi imaju brojnu i raznoliku mikrobiotu, pri čemu u mnogim slučajevima broj simbiotskih mikroorganizama i njihovih genetičkih informacija daleko prevazilaze količinu informacija kod domaćina. Pored toga, mikrobiota sa svojim genomom, a zajedno sa genomom domaćina, može da se prenosi iz generacije u generaciju i da tako propagira jedinstvene osobine holobionta i vrste. Mikrobiološki simbionti i domaćin su u međusobnoj interakciji koja na različite načine utiče na fiziologiju, zdravlje i fitnes holobionta u njegovoj životnoj sredini, a zbir ovih interakcija karakteriše holobionta kao jedinstvenu biološku cjelinu. Genetička variranja u hologenomom mogu biti uzrokovana promjenama u genomu domaćina ili u genomima mikrobiološke zajednice. Na promjene životne sredine i stres, mikrobiom se može prilagoditi brže nego sam genom domaćina i na taj način može poboljšati adaptaciju holobionta. Pojam holobiont je prvobitno uveden samostalno od strane Mindell (1992) i Margulis (1990) da opiše domaćina i njegovog primarnog simbionta; značenje je kasnije prošireno tako da uključuje domaćina i sve njegove simbiotske mikroorganizme, uključujući i viruse (Rohwer i sar., 2002). Pojam hologenoma je definisan kao suma genetičkih informacija o domaćinu i njegovim simbiotskim mikroorganizmima (Zilber-Rosenberg i Rosenberg, 2008).

Decenije dokumentovanja klinalne distribucije genetičke i fenotipske varijabilnosti organizama u različitim geografskim koordinatama potvrđuju da su lokalno prilagođeni fenotipovi rezultat selekcionog pritiska u okviru životne sredine (Hereford, 2009). Lokalna adaptacija predstavlja pojavu da su jedinke u populaciji bolje prilagođene da žive na jednom geografskom području, nego drugi pripadnici iste vrste koji žive na drugom području. Postoje brojni dokazi da mikrobiota značajno utiče na fenotipove životinja i da njen sastav varira klinalno, što upućuje da mikrobiotu treba uzeti u obzir u definicijama lokalne adaptacije (Henry i sar., 2019). Do nedavno, istraživanja o interakcijama između mikrobiote i strategije životne istorije domaćina su se fokusirala isključivo na to kako inter- i intraspecifične

varijacije u strategijama životne istorije domaćina utiču na mikrobiotu (Emmett i sar., 2017; Neave i sar., 2017). Suprotno pitanje, uticaj mikrobiote na strategiju životne istorije domaćina, se dosta rjeđe razmatra i slabije je istraženo, iako su kompromisi u životnoj istoriji dugo bili prepoznati kao široko rasprostranjena karakteristika lokalne adaptacije i bili su u fokusu mnogih empirijskih studija (Stearns, 1992; Hereford, 2009). Pored lokalne adaptacije, sastav mikrobiote kod nekih životinja može da varira u zavisnosti od geografskih odrednica kao što su geografska širina ili nadmorska visina (Suzuki i sar., 2019). Trenutno nije jasno da li su geografski obrasci u sastavu mikrobiote povezani sa lokalnom adaptacijom njihovih domaćina, ali ova ideja je sugerisana prethodnim istraživanjima gdje je uočeno da neke životinje mogu da modifikuju svoje fenotipove genetičkom kontrolom mikrobiote (Goodrich i sar., 2014; Chaston i sar., 2015), i da mikrobiota može da pokrene brzu evoluciju domaćina u prirodnom okruženju (Rudman i sar., 2019).

Uzimajući u obzir do sada poznati sastav mikroorganizama povezanih sa različitim životinjskim i biljnim vrstama, postoji dovoljno podataka da bi se izvele određene generalizacije, kako je dato u Rosenberg i Zilber-Rosenberg (2014), a to je da je diverzitet mikrobioloških vrsta i sojeva povezanih sa određenim vrstama visok, dok je diverzitet filuma obično nizak, iako u nekoliko slučajeva u kojima postoji veliki diverzitet bakterijskih vrsta, dominiraju određene bakterijske grupe. Mikrobiota povezana sa domaćinom se uglavnom razlikuje od mikrobiote u životnoj sredini koja ih okružuje, pri čemu je u nekim slučajevima pokazano da se slične, ali ne i identične mikrobiološke zajednice nalaze kod istih životinjskih ili biljnih vrsta koje su geografski udaljene, dok različite zajednice mogu da se nađu kod istih vrsta na istoj lokaciji (Fontana i sar., 2019; Goertz i sar., 2019; Gong i sar., 2020).

Istorijski gledano, istraživanje mikrobiote je proizašlo iz istraživanja mikrobiote životne sredine i pruža interdisciplinarnu platformu za mnoga polja, kao što su: poljoprivreda, bromatologija (nauka o hrani), biotehnologija, bioekonomija, matematika (informatika, statistika), patologija biljaka i posebno humana medicina. Novo polje je već donijelo nove i važne koncepte za opisivanje interakcija domaćin-mikroorganizam, kao što je teorija holobionta ili koncept metaorganizma. Nadalje, principi koevolucije i odgovora na stres unutar mikrobiote daleko prevazilaze tradicionalni obim ovih konceptata. Stegen i sar. (2018) predlažu jedinstven konceptualni okvir za predviđanje i kontrolu mikrobiote, koji je zasnovan na teoriji koja je primjenljiva na sve organizme i na pojedinačnim i kombinovanim uticajima tri sveobuhvatna faktora: istorijskim okolnostima, unutrašnjoj dinamici i spoljašnjim faktorima. Ovi faktori mogu imati deterministički uticaj na mikrobiotu, u smislu da mogu sistematski povećati sposobnost nekih taksona, dok neke druge mogu da potiskuju, pri čemu slučajni događaji rođenja i smrti mogu narušiti inače determinističku putanju. Ova tri glavna faktora, koji djeluju istovremeno i kontinuirano, su definisana na sljedeći način:

1. Istorijske okolnosti

Ovi faktori podrazumijevaju istorijske uslove, uključujući abiotičke i biotičke faktore koji dovode do trenutnih karakteristika mikrobiote i koji mogu uticati na to kako će organizam da reaguje na buduće promjene u životnoj sredini. Istorijski uslovi životne sredine dovode do specifičnih fizičko-hemijskih uslova koji predstavljaju početne uslove i koji utiču na to kako određene karakteristike, kao što je dostupnost resursa, reaguju na promjene životne sredine. Na primjer, istorija male količine padavina može promijeniti fizičku strukturu zemljišta,

mijenjajući time i količinu dostupnog organskog ugljenika za mikrobiotu. Biološki gledano, istorija formiranja zajednica može uticati na buduće odgovore zajednice na promjene u životnoj sredini. Istorija jake determinističke selekcije za mikrobiotu koja se sastoji od taksona posebno prilagođenih određenom okruženju, može dovesti do značajnog smanjenja diverziteta mikrobiote kada se okruženje promijeni. Na primjer, u populaciji gdje postoji istorija konstantno alkalnog pH, promjena na niski pH može dovesti do smanjenja diverziteta mikrobiote zbog taksona koji ne tolerišu nizak pH. Nasuprot tome, mikrobiota koja je formirana kroz više stohastičkih događaja može da sadrži širok skup taksona sposobnih da prežive u različitim uslovima životne sredine.

2. Unutrašnja dinamika

Ovi faktori podrazumijevaju faktore unutar mikrobiote koji dovode do njenih promjena tokom vremena, uključujući evolucionu dinamiku, interakcije između jedinki istih i različitih vrsta. Dinamika bilo koje ekološke zajednice može biti vođena procesima koji se odvijaju unutar samih zajednica, odnosno interakcijama unutar i između specifičnih vrsta. Ishod su često privremene tranzicije u sastavu zajednice u kojima rani kolonizatori povećavaju sposobnost drugih vrsta da opstanu, dok su ostale vrste potisnute, što se još naziva i autogena sukcesija. Autogena sukcesija mikrobiote životne sredine je posebno važna nakon akutnih promjena u sredini koje su intenzivne, ali kratkotrajne. Takve promjene imaju neposredan uticaj na mikrobiotu, a nakon što se takva promjena ukloni, dinamika koja slijedi treba da bude u velikoj mjeri vođena unutrašnjim procesima u kojima mikroorganizmi utiču jedni na druge i na svoju okolinu.

3. Spoljašnji faktori

Ovi faktori podrazumijevaju faktore koji utiču na vremensku dinamiku mikrobiote, uključujući abiotičke i biotičke pokretače koji nastaju imigracijom ili invazijom novih organizama koji ulaze u zajednicu, što se još i naziva alogena sukcesija. Uticaj spoljašnjih faktora na vremensku dinamiku mikrobiote može se posmatrati kao deterministički proces vođen sredinom. U ovom slučaju, preovlađujuće okruženje određuje koji taksoni imaju visoku ili nisku sposobnost preživljavanja. Važno je prepoznati da postoje varijacije u stepenu do kojeg okruženje sistematski diktira relativni uspjeh različitih taksona. Ovo se može posmatrati kao varijacija u jačini determinističke ekološke selekcije. U slučajevima kada jačina selekcije nije dovoljna da bi se prevazišli slučajni demografski događaji (imigracija, rođenje i smrt), vremenska dinamika se može smatrati stohastičkom.

Budući da navedeni faktori djeluju istovremeno, potrebne su nove teorijske i eksperimentalne pretpostavke koje uzimaju u obzir ove faktore i njihove međusobne interakcije da bi se omogućilo predviđanje i kontrola mikrobiote. Značajno je da je došlo do fundamentalne promjene paradigme u našem razumijevanju mikroorganizama i da je sada prihvaćeno da su svi eukarioti metaorganizmi i da se moraju posmatrati zajedno sa njihovom mikrobiotom kao neodvojivom funkcionalnom jedinicom. Ovaj koncept takođe uzima u obzir i činjenicu da patogeni predstavljaju samo mali dio mikroorganizama, dok gubitak raznovrsnosti može dovesti do takozvane „disbioze“, koja ima kaskadni uticaj na imunski sistem i nudi pogodnu sredinu za pojavu i širenje patogena (Berg i sar., 2020).

Pored gore pomenutih faktora, često je prisutna je i prostorna podjela mikroorganizama, koja opisuje fizičko razdvajanje mikrobiote na lokalne zajednice (Wu i sar., 2022). U različitim dijelovima crijeva (Welch i sar., 2017), korijena biljaka (Edwards i sar., 2015) i zemljišta (Bickel i Or, 2020), mikrobiološke zajednice su podijeljene u lokalne zajednice koje su međusobno fizički razdvojene. U najjednostavnijem slučaju, tamo gdje postoji podjela, svako lokalno okruženje se sastoji od podskupa svih članova, i takva podjela ograničava interakcije unutar lokalnih zajednica. Prostorno razdvajanje mikrobiote smanjuje ukupnu snagu interakcija u globalnim mikrobiološkim zajednicama i smanjuje broj vrsta u interakciji za svakog pojedinačnog člana (Wu i sar., 2022). Drugim riječima, prostorna podjela može da moduliše dinamiku mikrobiološke zajednice globalno, modulišući tip i snagu interakcija koje karakterišu svakog člana zajednice, i ima potencijal da doprinese studijama na nivou organizma o uticaju prostorne podjele na diverzitet lokalne i globalne mikrobiološke zajednice.

Ideja da raznovrsnost mikroorganizama može igrati kritičnu ulogu u promjenljivim uslovima sredine, naziva se „hipoteza o polisi osiguranja“ (engl. *the insurance hypothesis*) (Yachi i Loreau, 1999). U okviru ove hipoteze jedan domaćin može da sadrži u svojoj mikrobioti rezervu rijetkih mikroorganizama koji imaju potencijal da se umnože kada se promijene uslovi sredine i da pomognu domaćinu da se prilagodi i preživi u novom okruženju. Sa druge strane, postoje faktori koji ograničavaju broj vrsta mikroorganizama koji mogu preživjeti i održati se u višćelijskom organizmu. Mikroorganizmi mogu biti eliminisani zbog promjene unutrašnjih uslova kao što su životni ciklus, razvojni stadijum, ili promjene spoljašnjih uslova kao što su ishrana, hemijske materije i promjena staništa. Vjerovatno je najvažniji faktor imunski sistem domaćina, koji je odgovoran i za ograničavanje tipova mikroorganizama koji mogu preživjeti unutar domaćina, i za prepoznavanje i omogućavanje razvoja normalne mikrobiote.

Smatra se da su česte koristi koje domaćini dobijaju iz svoje mikrobiote posljedica jakog selekcionog pritiska na domaćina da bi razvio adaptaciju prema korisnim mikroorganizmima (Foster i Wenseleers, 2006). Međutim, dokazi o takvoj snažnoj kontroli od strane domaćina nad mikrobiotom su ograničeni na neke vrste i njihov značaju u poređenju sa faktorima životne sredine i stohastičkim procesima u oblikovanju mikrobiote povezane sa domaćinom je još uvijek predmet naučne rasprave (Spor i sar., 2011; Kers i sar., 2018). Bez jake kontrole domaćina teško je razumjeti zašto organizmi tako često imaju značajne koristi od svoje mikrobiote. Model koji rješava ovu kontradiktornost su predložili Foster i sar. (2017a), nazvanom „ekosistem na uzici“ (engl. *ecosystem on a leash*), i prema njeihovom modelu se mikrobiota ponaša slično kao ekosistem koji je uglavnom oblikovan interakcijama između samih mikroorganizama. Kontrola domaćina („uzica“) djeluje samo na mali podskup mikroorganizama koji utiču na fitnes domaćina. Na primjer, struktura mikrobiote *D. melanogaster* je povezana sa genotipom domaćina (Chaston i sar., 2015; Unckless i sar., 2015), što ukazuje na genotipsku kontrolu od strane domaćina. Niski, ali efikasni nivoi kontrole domaćina, kako ih je predložio model „ekosistema na uzici“, takođe obećavaju da će nam pomoći da bolje razumijemo interakciju *Drosophila* sa njenom mikrobiotom.

Zajednice mikroorganizama kod zdravih životinja mogu imati širok spektar uticaja na ekologiju i evoluciju domaćina (McFall-Ngai i sar., 2013). Mikrobiota može olakšati korišćenje inače neodgovarajućih izvora hrane raznim dopunskim hranljivim materijama, razgradnjom

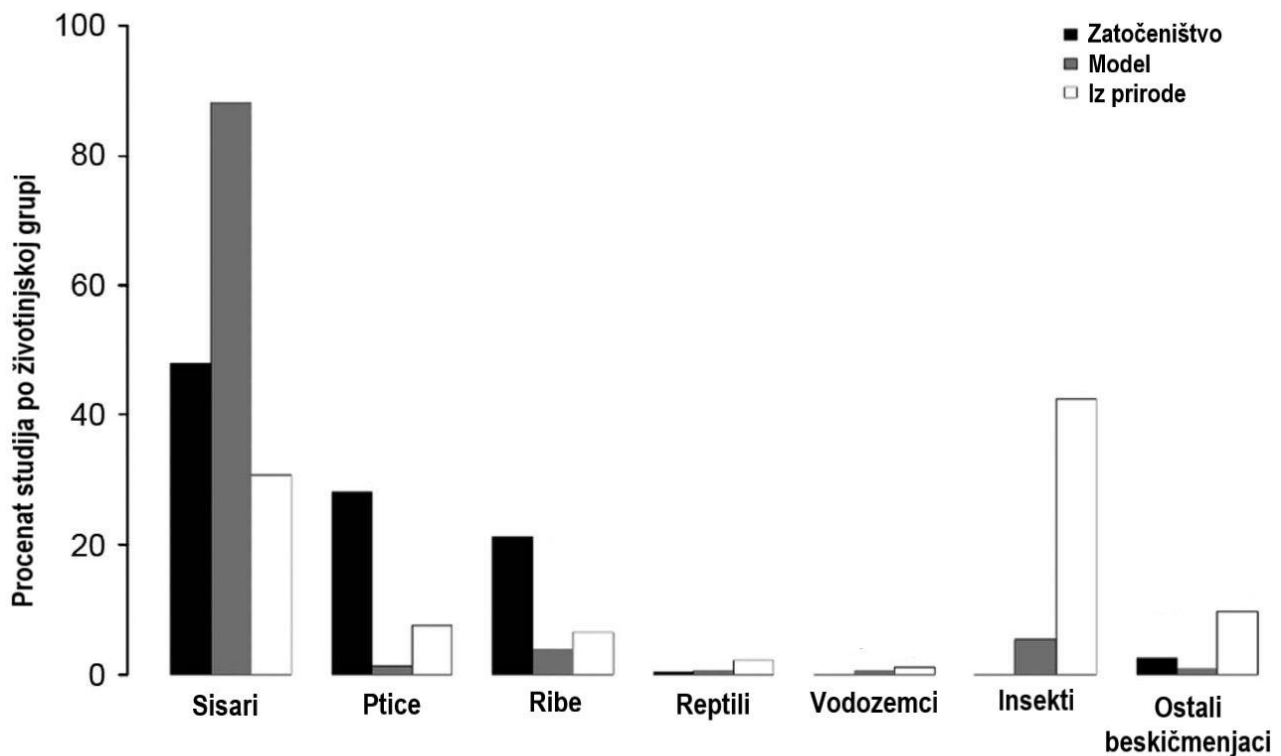
složenih dijetetskih makromolekula i detoksikacijom toksina (Karasov i Douglas, 2013; Brune, 2014; Hansen i Moran, 2014; Kohl i sar., 2014); pružiti zaštitu od prirodnih neprijatelja, posebno patogena (Stecher i Hardt, 2011), ali i uticati na osobine ponašanja koje utiču na protok gena, npr. preko izbora partnera i izbora mjesta za polaganje jaja (Lizé i sar., 2014; Mansourian i sar., 2016; Fischer i sar., 2017). Istraživanje mikrobiote je posebno značajno sa aspekta njenog uticaja na pojedinačne osobine životne historije kod domaćina, kao što je dužina života (Clark i sar., 2015), ali i na adaptivnu vrijednost domaćina u cjelini u promjenljivim uslovima životne sredine (Gould i sar., 2018).

U poređenju sa bogatstvom podataka koji se odnose direktno na uticaj mikrobiote na domaćine, uticaj njihovih interakcija na ekologiju i evoluciju same mikrobiote je dosta slabije istražen. U tom kontekstu, asocijacije se mogu klasifikovati kao „zatvorene“, pri čemu se mikroorganizmi obavezno vertikalno prenose i, shodno tome, često su izolovani od spoljašnjeg okruženja u okviru više generacija domaćina; ili kao „otvorene“, ukoliko su mikrobiološke zajednice unutar domaćina i one u spoljašnjem okruženju međusobno povezane, tako da mikroorganizmi iz spoljašnje sredine naseljavaju domaćina i mikroorganizmi povezani sa domaćinom se ispuštaju u spoljašnju sredinu često tokom života domaćina. Ekologija mikroorganizama u zatvorenim asocijacijama je definisana od strane domaćina i kada se održava u veoma dugim periodima (do milion godina), u evolucionoj putanji tih mikroorganizama dominira gubitak gena (McCutcheon i Moran, 2012). Otvorene asocijacije predstavljaju veoma različite selektivne pritiske za mikroorganizme, favorizujući osobine koje promovišu kolonizaciju domaćina, konkurentnost u interakcijama s drugim mikrobiološkim taksonima i, u mnogim slučajevima, sposobnost da opstanu i razmnožavaju se u spoljašnjem okruženju.

1.3.1. Diverzitet mikrobiote

Biodiverzitet je jedno od najšire proučavanih ekoloških svojstava i fundamentalno je za oblast same ekologije. Brojna su istraživanja biodiverziteta i on se često promovise kao indikator stanja ekosistema zbog njegove povezanosti sa produktivnošću, funkcionisanjem i stabilnošću ekosistema (Naeem i sar., 1994; Isbell i sar., 2015). Međutim, biodiverzitet se ne može procijeniti u univerzalnom okviru, već se umjesto toga mora sagledati u kontekstu ekosistema od interesa (Shade, 2017). Poteškoće u tumačenju biodiverziteta u ekosistemu, njegovih pokretača i posljedica koje izaziva, posebno su aktuelne kada se razmatraju mikrobiološki sistemi.

Brojne su studije koje se bave diverzitetom mikrobiote, pri čemu se kod većine životinja, uključujući i čovjeka, najveći broj simbionata nalazi u digestivnom traktu (Slika 2).



Slika 2. Procenat studija mikrobiote crijeva u okviru tri grupe životinja: u zatočeništvu (crna), model organizmi (siva) ili iz prirode (bijela), u okviru različitih životinjskih taksona (Pascoe i sar., 2017).

Često broj simbiotskih ćelija premašuje broj ćelija domaćina, pa je tako procijenjeno da broj mikroorganizama koji naseljavaju gastrointestinalni trakt čovjeka iznosi oko 10^{14} , što predstavlja približno 10 puta više bakterijskih ćelija u odnosu na broj ljudskih ćelija i preko 100 puta veću količinu metagenoma u odnosu na ljudski genom (Bäckhed i sar., 2005; Gill i sar., 2006). Međutim, nedavno revidirana procjena sugerše da je odnos ljudskih ćelija naspram bakterijskih ćelija zapravo bliži omjeru 1:1 (Sender i sar., 2016). Generalno, životinje sadrže oko 10^9 bakterija po gramu vlažne mase (Rosenberg i Zilber-Rosenberg, 2014). Što se tiče biljaka, bakterije su daleko najbrojniji kolonisti listova biljaka, pronađeni su u vrijednostima i do 10^8 ćelija po gramu, pri čemu su dovoljno brojne da doprinesu fiziologiji pojedinačnih biljaka na kojima žive (Lindow i Brandl, 2003). U rizosferi biljaka se nalazi 10^5 – 10^6 gljiva i 10^7 – 10^9 bakterija po gramu tla (Sylvia i sar., 2005), pri čemu je najveća koncentracija vezana za epidermis korijena.

Nekoliko studija je testiralo uzroke variranja diverziteta bakterijskih zajednica u crijevima različitih životinjskih vrsta. Među slijepim miševima Novog svijeta (Phyllostomidae), diverzitet crijevnih bakterija je bio povezan sa strategijom ishrane, pri čemu je diverzitet bio najveći kod slijepih miševa koji se hrane voćem, a najmanji kod onih koji se hrane krvlju (Phillips i sar., 2012). Godon i sar. (2016) su otkrili da je kod životinja u zatočeništvu (uključujući ptice, sisare i gmizavce), diverzitet crijevne mikrobiote generalno veći kod herbivora i da je to u pozitivnoj korelaciji sa veličinom tijela (mjereno Simpsonovim indeksom). Insekti sa jednostavnom ishranom često imaju bakterijske zajednice malog diverziteta. Gusjenice, koje imaju kratko vrijeme gastrointestinalnog tranzita i kratka crijeva, imaju veoma nizak diverzitet bakterijskih zajednica, a koje uglavnom čine vrste koje potiču iz

samog biljnog materijala kojim se domaćin hrani (Hammer i sar., 2017). Pčele i vrste roda *Drosophila* takođe imaju nizak diverzitet bakterijskih vrsta u svojim crijevima (Engel i sar., 2012; Wong i sar., 2013). U slučaju nekih vrsta *Drosophila*, jedinke mogu izgubiti svoju mikrobiotu u laboratorijskim uslovima, ukoliko se ona ne dopunjava bakterijama iz hranljive podloge (Blum i sar., 2013).

Više od jednog vijeka, naučnici su se u velikoj mjeri oslanjali na pristupe uzgoja bakterija u kulturi da bi ustanovili fiziološka i biohemijska svojstva mikroorganizama. Iako se čini da se značajan skup mikroorganizama može kultivisati, procjenjuje se da na Zemlji postoji čak 10^{12} vrsta bakterija, arhea i gljiva (Oberhardt i sar., 2015). Razlozi zbog kojih se samo dio mikroorganizama može izolovati i uzgajati u laboratorijskim uslovima uključuju ulazak mikroorganizama u stadijum mirovanja nakon što su uklonjeni iz prirodnog staništa, nedostatak esencijalnih hranljivih materija ili signalnih molekula i složeni odnosi metaboličkih interakcija između članova mikrobiološke zajednice (Ha i Devkota, 2020). Iz tih razloga, istraživanje diverziteta i funkcije mikrobiote je progresivno zamijenjeno pristupima nezavisnim od kulture, u prvom redu NGS sekvenciranjem (Hamady i Knight, 2009; Su i sar., 2012). Najpopularniji pristup se zasniva na ekstrakciji ukupne DNK iz tkiva, umnožavanju bakterijskih 16S rRNK gena pomoću PCR tehnologije i sekvenciranjem ovih gena. Sekvence sa identitetom većim od 97% su tipično dodijeljene istoj vrsti, one sa preko 95% identiteta su tipično dodijeljene istom rodu, dok su one sa više od 80% identiteta obično dodijeljene istom tipu (Kampfer i Glaeser, 2013), iako su ove razlike proizvoljne i zavise od više faktora. Kod životinja i biljaka koje se razmnožavaju polnim putem, sposobnost dva organizma da se ukrštaju i dobiju plodno potomstvo je opšte prihvaćena kao jednostavan pokazatelj da organizmi dijele dovoljno gena da bi se smatrali članovima iste vrste. Pošto se ovaj kriterijum generalno ne može primijeniti na prokariote, 97% identiteta gena za 16S rRNK se rutinski koristi za definisanje vrste.

1.3.2. Mikrobiota kičmenjaka i čovjeka

Ljudska mikrobiota sadrži stotine vrsta i trilion e ćelija koje se nalaze pretežno u gastrointestinalnom traktu (Gill i sar., 2006). Ovi mikroorganizmi pružaju mnoge zdravstvene prednosti, uključujući razlaganje složenih molekula u hrani, zaštitu od patogena i zdrav razvoj imuniteta (Bäckhed i sar., 2005; Mazmanian i sar., 2008; Lee i Mazmanian, 2010; Dethlefsen i Relman, 2011). Mikrobiota crijeva kod ljudi je poznata po svojoj ekološkoj stabilnosti. Različite osobe mogu posjedovati različite mikrobiološke vrste, ali kod svakog pojedinca postoji tendencija da je isti ključni skup vrsta zastupljen tokom dužeg perioda života (Vanhoutte i sar., 2004; Dethlefsen i Relman, 2011; Faith i sar., 2013). Ova stabilnost se smatra izuzetno važnom za zdravlje i dobrobit domaćina, jer osigurava da se korisni simbionti i njihove povezane funkcije održavaju tokom vremena (Lozupone i sar., 2012; Relman, 2012). Shodno tome, velike promjene u sastavu mikrobiote su često povezane sa lošim zdravljem (Coyte i sar., 2015). Poremećaji normalne ravnoteže između mikrobiote crijeva i domaćina povezani su sa gojaznošću (Ley i sar., 2006), neuhranjenošću (Kau i sar., 2011), inflamatornom bolešću crijeva (IBD) (Frank i sar., 2007), neurološkim poremećajima (Gonzalez i sar., 2011) i slično. Razumijevanje uticaja mikrobiote crijeva na zdravlje, zahtijeva

pomjeranje fokusa sa pojedinačnih patogena na pristup koji posmatra zajednicu kao cjelinu. Prvi korak u razumijevanju simbiotske veze između crijevnih mikroorganizama i njihovog domaćina je karakterizacija osnovne zdrave mikrobiote i razlika koje su povezane sa bolešću. Projekti velikih razmjera kao što su Evropska metagenomika ljudskog crijevnog trakta (engl. *European Metagenomics of the Human Intestinal Tract*, MetaHIT) i američki Projekat humanog mikrobioma (engl. *Human Microbiome Project*, HMP) su ostvarili značajan napredak ka ovom cilju. Međutim, složenost mikrobiote i varijacije između i unutar pojedinaca otežavaju definiciju onoga što predstavlja normalno stanje unutar populacije ili pojedinca.

Razvijanjem metoda NGS sekvenciranja, napravljen je značajan doprinos u razumijevanju interakcija domaćin-mikroorganizam i specifičnih funkcija crijevne mikrobiote u različitim uslovima sredine. Upravo ove metode su ukazale na postojanje velike mikrobiološke raznolikosti koja je veoma varijabilna tokom vremena i među populacijama. Svaki čovjek ima više od 1.000 filotipova na nivou vrste, koji predstavljaju klastere sekvenci koje imaju onoliko diverziteta u svojim malim podjedinicama rRNK gena, koliko ih ima navedena vrsta (Claesson i sar., 2009). Kod odraslog čovjeka, filumi Bacteroidetes i Firmicutes obično dominiraju mikrobiotom, dok su filumi Actinobacteria, Proteobacteria i Verrucomicrobia generalno manje zastupljeni (Eckburg i sar., 2005). U crijevima čovjeka su prisutne i metanogene arhee (uglavnom *Methanobrevibacter smithii*), eukarioti (uglavnom kvasci) i virusi (uglavnom fagi). Uprkos konzistentnosti glavnih komponenti mikrobiote, njihove relativne proporcije i prisutne vrste značajno variraju među individuama. Pokušaji da se pronađe osnovni skup filotipova na nivou vrste u mikrobioti odraslih ljudi, identifikovali su nekoliko glavnih kandidata, uključujući *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia intestinalis* i *Bacteroides uniformis* (Qin i sar., 2010), ali kod nekih osoba čak i oni mogu predstavljati manje od 0,5% prisutnih mikroorganizama (Turnbaugh i sar., 2009). Uzorci dobijeni tokom vremena od iste osobe sličniji su jedni drugima od onih koji su dobijeni od različitih pojedinaca, što sugerise da svaki čovjek ima relativno različitu, stabilnu zajednicu (Turnbaugh i sar., 2009). U interesantnoj komparativnoj studiji mikrobiote distalnog crijeva primata (uključujući i čovjeka), otkriveno je da su rezultati filogenetske analize između mikroorganizama i domaćina, potpuno podudarni sa poznatim filogenetskim odnosima među domaćinima (Ochman i sar., 2010). Iako su crijeva od početka i kontinuirano tokom života izložena mikroorganizmima koji se usvajaju iz spoljašnjih izvora i pod uticajem ishrane, studija je utvrdila da je tokom evolucije sastav crijevne mikrobiote među vrstama velikih majmuna filogenetski očuvan i da je divergirao na način koji je u skladu sa vertikalnim nasljeđivanjem.

Danas, po nekim autorima, crijeva sisara predstavljaju jedan od glavnih rezervoara mikrobiološkog biodiverziteta na Zemlji (Thompson i sar., 2017), ali njihov uticaj na evoluciju i diversifikaciju ostaje uglavnom neistražen. Eksperimentalne studije su pokazale da je mikrobiota crijeva sisara povezana sa fenotipovima domaćina koji obuhvataju neuroendokrini, imunski i metabolički sistem, uključujući osobine povezane sa fitnessom i adaptivnim razlikama između vrsta (Nicholson i sar., 2012). Na nivou filuma, bakterijske zajednice u crijevima sisara su međusobno slične, ali ne i na nivou vrste. Od više od 50 poznatih bakterijskih filuma (Youssef i sar., 2015), miševe, kao i ljude, kolonizuju uglavnom vrste filuma Firmicutes (filum koji sadrži rodove poput *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*), Bacteroidetes (sa rodovima poput *Bacteroides*, *Porphyromonas*), Actinobacteria (sa rodovima poput *Actinomyces*, *Streptomyces*) i

Proteobacteria (koji sadrži porodicu Enterobacteriaceae sa vrstama poput *Escherichia coli* ili *Helicobacter*). Sastav i složenost variraju u različitim dijelovima tijela, pri čemu se najveći broj vrsta nalazi u debelom crijevu, a samo nekoliko vrsta u želucu ili genitalnom traktu (Dethlefsen i sar., 2007; Sheh i Fox, 2013). Laboratorijski miševi, iako su jako važni za razumijevanje osnovnih bioloških fenomena, ograničeni su u modelovanju složenih bolesti ljudi i drugih sisara. Rosshart i sar. (2017) su imali za cilj da identifikuju prirodno evoluiranu referentnu mikrobiotu populacije miša (*Mus musculus domesticus*) kako bi bolje rekapitulirali relevantne fiziološke fenomene i njihovi nalazi ukazuju na to da se mikrobiota crijeva laboratorijskih miševa značajno razlikuje od genetički slične prirodne populacije *M. m. domesticus*. Takođe su utvrdili da se crijevna mikrobiota miševa iz prirode može prenijeti na laboratorijske jedinke i održavati tokom najmanje nekoliko generacija u laboratorijskim uslovima, pri čemu je mikrobiota miševa iz prirode u odnosu na mikrobiotu laboratorijskih miševa poboljšala fitnes domaćina i povećala rezistentnost na neke bolesti.

U mikrobioti crijeva ptica dominiraju filumi Firmicutes i Proteobacteria, dok su filumi Bacteroidetes i Actinobacteria zastupljeni u manjem procentu. I domaće i divlje vrste ptica imaju visoku relativnu zastupljenost filuma Proteobacteria (25%), dok se kod ljudi on javlja sa manje od 1% zastupljenosti (Grond i sar., 2018). Studija Videvall i sar. (2020) je pokazala da je narušavanje crijevnih bakterijskih zajednica kod mladih nojeva (*Struthio camelus*), u smislu promjene u sastavu taksona i niskog alfa diverziteta, povezano sa visokom stopom mortaliteta.

Kolonizacija crijeva riba počinje rano u fazi larve i kontinuirano vodi ka postizanju složene zajednice mikroorganizama (Nayak, 2010). Utvrđen je nizak diverzitet mikrobiote kod riba, pri čemu filumi Proteobacteria, Firmicutes i Bacteroidetes predstavljaju oko 90% mikrobiote riba sa različitim vrstama, dok filumi Fusobacteria, Actinobacteria i Verrucomicrobia predstavljaju manje zastupljene filume. Diverzitet se povećava kako se ishrana riba mijenja od karnivora preko omnivora do herbivora (Liu i sar., 2016). Sastav mikrobiote se takođe razlikuje i zbog različitih uslova okoline, pa tako *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Lactococcus* i *Pseudomonas*, obavezni anaerobi *Bacteroides*, *Clostridium* i *Fusobacterium* i članovi porodice Enterobacteriaceae dominiraju u crijevima slatkovodnih vrsta (Gómez i Balcázar, 2008). U crijevima morskih riba dominiraju rodovi *Vibrio*, *Photobacterium* i *Clostridium* (Egerton i sar., 2018). Zastupljenost sličnih bakterijskih filuma, bez obzira na taksonomski položaj ili geografski položaj riba ukazuje na ulogu mikrobiote u važnim funkcijama domaćina kao što su apsorpcija hranljivih materija, varenje i stvaranje imunskog odgovora (Talwar i sar., 2018).

Studije diverziteta mikrobiote kod reptila su aktuelne posljednjih godina i u velikoj mjeri su zasnovane na istraživanju mikrobiote kornjača, gdje je utvrđen veliki uticaj ishrane, geografije i ontogenije na mikrobiološke zajednice domaćina (Fong i sar., 2020). Jedinke koje su herbivori su imale mikrobiotu u kojoj je dominirao filum Firmicutes, dok su jedinke koje su karnivori imale mikrobiotu u kojoj je dominirao filum Bacteroidetes (David i sar., 2014). Poređenjem zastupljenosti bakterijskih taksona kod jedinki iz prirode i onih u zatočeništvu, identifikovani su potencijalno važni članovi mikrobiote crijeva kornjača. Rodovi koji su značajno zastupljeniji u prirodnim populacijama su bili *Citrobacter*, neklasifikovani rod iz porodice Burkholderiaceae, *Plesiomonas*, *Hafnia-Obesumbacterium*, *Acinetobacter* i *Lactococcus*, dok su značajno zastupljeniji rodovi kod jedinki u zatočeništvu bili *Clostridium*,

Turicibacter, *Terrisporobacter* i neklasifikovani rod iz porodice Lachnospiraceae (Fong i sar., 2020). Nedavno je pokazano da i mikrobiotom crijeva krokodila takođe dominira filum Firmicutes, uglavnom sa rodovima *Clostridia* i *Fusobacteria*, pri čemu je najzastupljenija vrsta bila *Clostridium difficile*. Ovakav sastav je veoma sličan i sastavu mikrobiote crijeva kod aligatora (Siddiqui i sar., 2021).

1.3.3. Mikrobiota insekata

Insekti su daleko najraznovrsnija i najzastupljenija životinjska klasa, kako po broju vrsta na globalnom nivou, tako i po širini ekosistema koje naseljavaju i po biomasi (Basset i sar., 2012). Porast diverziteta i evolucionih uspjeh insekata su djelimično zavisili od njihovih mnogobrojnih odnosa sa korisnim mikroorganizmima, za koje se zna da poboljšavaju ishranu siromašnu hranljivim materijama, pomažu varenje, štite od predatora, parazita i patogena, doprinose inter- i intraspecijskoj komunikaciji, utiču na efikasnost kao prenosioci bolesti, i upravljaju sistemima za parenje i reprodukciju. Poznavanje uticaja mikroorganizama na insekte je važno za više oblasti primjene, kao što su medicina, poljoprivreda, konzervaciona biologija i ekologija. Neke vrste insekata pružaju dobre laboratorijske modele za istraživanja mikrobioloških zajednica i njihovih interakcija sa domaćinima, posebno za razumijevanje imuniteta i metaboličkih interakcija (Lemaitre i Hoffmann, 2007). Kod insekata koji su prenosioci bolesti, simbiotski mikroorganizmi mogu da utiču na efikasnost prenosa štetnih mikroorganizama (Ricci i sar., 2012) ili na dužinu razvića (Chouaia i sar., 2012) i da na taj način obezbijede ciljeve za potencijalnu kontrolu bolesti. Sveobuhvatno razumijevanje biologije insekata zahtijeva da se oni proučavaju u ekološkom kontekstu sa mikroorganizmima kao važnom komponentom sistema.

Kod većine vrsta insekata, mikrobiološke zajednice su posebno zastupljene u digestivnom traktu (Engel i Moran, 2013). Mikroorganizmi u crijevima insekata mogu uključivati protiste, gljive, arhee i bakterije (Gurung i sar., 2019). Protisti su najbolje proučavani kod nižih termita i žohara (Blattidae), kod kojih njihovo održavanje zavisi od društvenog prenosa (Hongoh, 2010). Gljive i metanogene arhee su česte u crijevima insekata koji se hrane drvetom ili detritusom i vjerovatno imaju ulogu u varenju. Bakterijske vrste uglavnom obuhvataju sve ili većinu mikroorganizama u crijevima većine insekata. Ove bakterijske zajednice se veoma razlikuju po ukupnoj količini, sastavu, kao i po lokacijama i funkcijama u crijevima. Na primjer, odrasla medonosna pčela (*Apis mellifera*) sadrži oko 10^9 bakterijskih ćelija (Martinson i sar., 2012), a sličan broj se nalazi i kod odraslih stjenica (*Rhodnius sp.*) i kućnog popca (*Acheta domesticus*) (Santo Domingo i sar., 1998; Eichler i Schaub, 2002), dok odrasli skakavac (*Melanoplus sanguinipes*) sadrži oko 10^6 bakterija (Mead i sar., 1988), a odrasla *D. melanogaster* ima oko 10^5 bakterija (Ren i sar., 2007; Ryu i sar., 2010). Većina insekata koji se hrane biljnim sokom sadrže malo ili uopšte nemaju crijevne bakterije koje se mogu detektovati (Cheung i Purcell, 1993), ali umjesto toga sadrže intracelularne simbiote (Baumann, 2005).

Bakterije izolovane iz crijeva potkornjaka (*Dendroctonus sp.*) (Briones-Roblero i sar., 2017), asamskog svilenog moljca (*Antheraea assamensis*), žute kukuruzne sovice (*Helicoverpa armigera*), kupusovog moljca (*Plutella xylostella*) (Gandotra i sar., 2018), svilene bube

(*Bombyx mori*) (Anand i sar., 2010) i jedne vrste zlatice (*Cassida rubiginosa*) (Salem i sar., 2017), pokazuju enzimski kapacitet za hidrolizu celuloze, lipida, skroba, pektina i estara. Usporedne studije sa konvencionalno i aseptički uzgajanim insektima su pokazale da bakterije u crijevima mogu značajno doprinijeti varenju lipida i proteina, detoksikaciji sekundarnih biljnih metabolita i modifikaciji hemijski isparljivih profila insekata domaćina kod graškove gusjenice (*Anticarsia gemmatalis*) (Visôtto i sar., 2009) i velikog brašnara (*Tenebrio molitor*) (Genta i sar., 2006), a takođe mogu da utiču na preživljavanje, veličinu i polaganje jaja kod određenih vrsta komaraca (*Aedes aegypti* i *Aedes atropalpus*) (Coon i sar., 2016). Nedavno istraživanje je takođe pokazalo da bakterijske zajednice u crijevima igraju važnu ulogu u otpornosti na insekticide (Xia i sar., 2018b).

Različiti filumi bakterija su obično prisutni u crijevima insekata, kao što su Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, uključujući vrste *Lactobacillus* i *Bacillus*, zatim Clostridia, Actinomycetes, Spirochetes, Verrucomicrobia, Actinobacteria, i drugi (Colman i sar., 2012). Širok raspon asocijacija insekata sa crijevnim mikroorganizmima ilustriran je u okviru podreda Heteroptera (red Hemiptera), koji uključuje različite insekte sa usnim aparatom za sisanje, koji se hrane biljnim ili životinjskim tečnostima. Mnoge vrste Heteroptera koje se hrane biljkama imaju srednje crijevo sa kriptama u kojima se nalaze zajednice simbiotskih bakterija. U ekstremnom slučaju, ovi crijevni simbioti se mogu nasljeđivati i približiti se intracelularnim simbiotima po svom nivou specijalizacije. Najbolje proučen primjer je *Ishikawaella capsulata*, koja živi u specijalizovanim kriptama u crijevima japanske vrste plataspide (*Megacopta punctatissima*) (Fukatsu i Hosokawa, 2002). *I. capsulata* ima sva obilježja obaveznog nutritivnog simbionta povezanog sa bakteriocitima, uključujući vertikalnu transmisiju i koevoluciju sa domaćinom, smanjenu veličinu genoma i posjeduje gene koji omogućavaju snabdijevanje domaćina hranljivim materijama (Hosokawa i sar., 2006). Ova simbiotska bakterija postiže jako efikasan vertikalni prenos na način da ženke *M. punctatissima* koje polože jaja, luče sadržaj iz crijeva kako bi se formirala specijalizovana simbiotska kapsula na spoljašnjoj strani jajeta, kojom se juvenilne forme hrane odmah po izlijeganju (Hosokawa i sar., 2006). Međutim, neke vrste Heteroptera se oslanjaju na ekološko sticanje specifičnog soja simbionta svake generacije, što implicira da crijeva domaćina biraju odgovarajuće bakterijske sojeve iz niza organizama koji se unesu putem hrane. Na primjer, vrsta insketa *Riptortus pedestris* oralno unese u svakoj generaciji specifičnog simbionta iz roda *Burkholderia*, a on formira guste kolonije u kriptama srednjeg crijeva (Kikuchi i sar., 2005). Domaćini koji ne uspiju da steknu simbionta tokom određenog razvojnog perioda koji se poklapa sa pojavom kripte, pokazuju zaostali rast (Kikuchi i sar., 2011).

Drugi jasni slučajevi specijalizovanih crijevnih simbionata koji se prenose vertikalnom transmisijom nalaze se kod insekata organizovanih u društva, uključujući pčele i termite. Kod medonosne pčele (*A. mellifera*), bakterijski simbioti ograničeni na zadnja crijeva odraslih jedinki se dobijaju u prvih nekoliko dana nakon izlaska odraslih jedinki iz stadijuma lutke, kroz interakcije sa drugim odraslim pčelama radilicama u koloniji (Martinson i sar., 2012). Stanovnici crijeva medonosne pčele pripadaju malom broju karakterističnih linija koje se nalaze samo kod pčela i bumbara (rod *Bombus*) (Martinson i sar., 2011). Dakle, vertikalni prenos kroz interakcije među članovima društva može olakšati koevoluciju odnosa domaćin-simbiont i pojavu karakteristične zajednice crijeva. Mravi takođe pokazuju brojne

specijalizovane crijevne bakterije i sa njima povezane morfološke modifikacije crijeva. Detaljnijim istraživanjem mrava i njihovih bakterijskih simbionata, otkrivene su relativno jednostavne zajednice koje uključuju karakteristične simbiote crijeva za koje se pretpostavlja da su povezani i sa načinom ishrane, ali i sa filogenetskim odnosima. Ovakav sastav mikrobiote sugerše koevoluciju određenih linija mrava sa specijalizovanim simbiotskim bakterijama (Anderson i sar., 2012). Zajednice crijeva termita su složenije, obično sadrže stotine vrsta ili filotipova što je zaključeno na osnovu analize 16S rRNK gena. Štaviše, većina sekvenci dobijenih iz crijeva termita je bila drugačija od bakterija iz okoline, što sugerše da su većina ovih bakterija specijalisti za crijeva termita, a ne bakterije iz životne sredine koje su unijete u organizam hranom (Eggleton, 2011).

1.3.4. Mikrobiota vrsta roda *Drosophila*

Vrste roda *Drosophila* iz više razloga predstavljaju pogodan model za ispitivanje promjena sastava mikrobiote tokom različitih faza života domaćina u stabilnim i promjenljivim uslovima sredine. Rod *Drosophila* zastupljen je sa brojnim vrstama koje naseljavaju skoro sve ekosisteme, a neki predstavnici roda su modeli istraživanja u različitim granama biologije (neurobiologiji, biologiji razvića, ekologiji, genotoksikologiji, genetičkom inženjerstvu). Pojedine vrste, kao *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. subobscura*, *D. obscura* i slično, jednostavne su za manipulisanje i ekonomične za održavanje u laboratoriji, kratkog životnog ciklusa tokom kojeg produkuju brojno potomstvo tačno definisanih razvojnih stadijuma: embrion, larva, lutka i adult. Postoji veliki broj dostupnih rezultata istraživanja, a sekvenciranje genoma nekih vrsta je kompletirano; genomski projekat kosmopolitske vrste *D. melanogaster* je završen 2000. godine. Pojedine vrste, kao što je *D. subobscura*, su od velikog značaja kao pokazatelji promjena ekoloških parametara, na primjer temperature, ili drugih selekcionih pritisaka vezanih za promjene sredine, dok su neke, kao što je *D. suzukii*, invazivne i štetne za pojedine poljoprivredne kulture voća. Dodatno, osim za endemske vrste, za rad sa ovim insektima postoji manje etičkih problema, budući da su ovi insekti isključeni iz zakona koji se odnose na upotrebu životinja u istraživanjima, u većini zemalja.

Vrste roda *Drosophila* su generalno domaćini samo malom broju bakterijskih populacija, pri čemu uključuju i vrste prisutne u ljudskoj mikrobioti. Mikrobiota *D. melanogaster* u laboratoriji je predstavljena bakterijskom zajednicom niskog diverziteta (Wong i sar., 2011), ali sa velikim implikacijama na njeno ukupno zdravlje kao što su urođeni imunitet (Ryu i sar., 2008), životni vijek (Fast i sar., 2018; Iatsenko i sar., 2018), ishrana i reprodukcija (Leitão-Gonçalves i sar., 2017) i ponašanje (Jia i sar., 2021; Silva i sar., 2021). Promjene u mikrobioti mogu dovesti do ozbiljnih posljedica na fiziologiju domaćina, uzrokujući čak i smrt (Clark i sar., 2015), te je stoga važno da se ispituju faktori koji oblikuju sastav i diverzitet mikrobiote i implikacije koje ona može imati na domaćina. Utvrđeno je da postoji nekoliko faktora koji mogu da oblikuju mikrobiotu kod *Drosophila*, kao što je ishrana (Erkosar i sar., 2018), faktori spoljašnje sredine (Moghadam i sar., 2018) i genetička osnova domaćina (Dobson i sar., 2015). U ishrani vrsta roda *Drosophila* u prirodi su prisutni mikroorganizmi koji posreduju u truljenju plodova i drugog raspadajućeg biljnog materijala (Keller, 2007). Drugim riječima, *Drosophila* je mikrobivor i mnogi mikroorganizmi koji se unesu u crijeva podliježu digestiji,

dajući kvantitativno važan doprinos ishrani domaćina. Sposobnost unijetih mikroorganizama da opstanu i umnožavaju se u crijevima *Drosophila* varira među različitim izolatima mikroorganizama, kao i među pojedinačnim jedinkama jednog izolata. Na primjer, u studiji o sudbini bakterije *Acetobacter tropicalis* koju su progutale odrasle jedinke *D. melanogaster*, utvrđeno je da je jedna trećina *A. tropicalis* prošla kroz crijeva zajedno sa hranom, 10-20% je opstalo u crijevima, a ostatak je izgubljen, vjerovatno varenjem u lumenu crijeva (Inamine i sar., 2018). Neki mikrobiološki taksoni su vjerovatno podvrgnuti ponovljenim prelazima između hrane i crijeva oralno-fekalnim ciklusom unutar jedne kulture *D. melanogaster* u laboratoriji (ili voća na terenu), sa nepoznatim i potencijalno važnim efektima na njihove metaboličke osobine (Douglas, 2018).

Iako su efekti ishrane široko istraženi kod mnogih vrsta roda *Drosophila* (Burger i sar., 2007; Matzkin i sar., 2011), još uvijek nije jasno da li su fenotipske promjene koje oni izazivaju rezultat isključivo faktora ishrane ili pored toga uključuju i neke indirektne uticaje od strane mikrobiote. Henry i sar. (2020) su istraživali kako kalorijski sadržaj hrane (koncentracija šećera i kvasca) i sastav (odnos šećer:kvasac) utiču na fenotipske osobine *D. melanogaster* i pokazali su da je sastav hrane mnogo važniji od kalorijskog sadržaja za većinu praćenih osobina u ovoj studiji. *D. melanogaster* koje su uzgajane na supstratu siromašnom kvascem, bez obzira na sadržaj šećera, odlikovale su se sporim razvićem, malom tjelesnom masom, velikim energetske rezervama, visokom brzinom metabolizma i povećanom tolerancijom na stres. Mikrobiota je takođe uticala na mnoge osobine u interakciji sa hranom, ali je efekat ovih interakcija uglavnom bio manji u poređenju sa uticajem hrane.

Iako se smatra da je ishrana ključna determinanta u sistemu *Drosophila*-mikrobiota, pronađene su razlike u mikrobioti genetički diferenciranih linija *D. melanogaster* koje su održavane na identičnoj ishrani četiri godine. To ukazuje na činjenicu da je populacija domaćina takođe važan faktor koji određuje sastav bakterijskih zajednica sa kojima je povezan. Dio razlika u mikrobioti može biti uzrokovan genetičkim varijacijama (npr. u imunitetu ili fiziologiji crijeva), ili može da odražava sastav mikrobiote koji su oni stekli u svom prirodnom okruženju (Chaplinska i sar., 2016). Detaljnom fenotipskom analizom bakterija izolovanih iz crijeva mušica i poređenjem ovih bakterija sa bliskim srodnicima izolovanim iz drugih sredina, utvrđeno je da su izolati različitih vrsta bakterija varirali u svom odgovoru na atmosferski kiseonik, kapacitetu da koriste različite izvore ugljenika i da tolerišu različite hemijske stresore, pokazujući na taj način da bakterije sa različitim fenotipskim osobinama mogu kolonizovati crijeva *D. melanogaster* (Newell i sar., 2014). Ovaj zaključak je dodatno potkrijepljen sposobnošću bakterijskih izolata koji ne potiču iz mušica da uspješno kolonizuju njihova crijeva. Ipak, izolati iz mušica i oni koji su izolovani iz drugih sredina su se razlikovali po svom uticaju na osobine domaćina, što je pružilo mogućnost da se identifikuju kandidat geni relevantni za simbiozu bakterija i *Drosophila*. Uporednim genomskim analizama identifikovane su višestruke genetičke razlike, a predviđa se da uključuju gene koji doprinose adaptaciji bakterija na uslove u crijevima.

Metaboličke interakcije su u srži mnogih simbioza, a vjerovatno je to slučaj i sa mikrobiotom crijeva vrsta roda *Drosophila*. Nekoliko studija implicira proizvodnju vitamina B od strane mikrobiote crijeva kao važnu osobinu za razvoj larvi kod *D. melanogaster* (Blatch i sar., 2010; Fridmann-Sirkis i sar., 2014; Wong i sar., 2014). U tom kontekstu, utvrđeno je da *Lactobacillus brevis* i *Lactobacillus plantarum* mogu da sintetišu riboflavin i omoguće brži

razvoj, što sugerirše da je sposobnost proizvodnje riboflavina važna osobina simbiotske funkcije roda *Lactobacillus* u razvoju *Drosophila* (Newell i sar., 2014).

Pored metaboličkih interakcija, mikrobiota *D. melanogaster* učestvuje u nizu sistemskih efekata na domaćina. Jedna studija je sugerisala da prisustvo bakterija u različitim fazama adultnog života može ili povećati ili smanjiti životni vijek domaćina (Brummel i sar., 2004). Ova zapažanja su kasnije dovedena u pitanje studijom u kojoj nije pronađena razlika u životnom vijeku između konvencionalnih i akseničnih mušica (Ren i sar., 2007). Uprkos ovim kontradiktornim rezultatima, postoje ubjedljivi dokazi da bakterije u crijevima mogu da poboljšaju rast i razvoj *D. melanogaster* modulacijom hormonske signalizacije (Shin i sar., 2011; Storelli i sar., 2011), korišćenjem bakterija *Acetobacter pomorum* (komensalne bakterije koja je često izolovana iz digestivnog trakta *D. melanogaster*) i *L. plantarum*. Obje studije su pokazale da *A. pomorum* i *L. plantarum* poboljšavaju rast i razvoj domaćina promovišući insulinsku signalizaciju. Studija koja je takođe koristila *L. plantarum* za kolonizaciju akseničnih jedinki *D. melanogaster*, otkrila je da sastav mikrobiote crijeva određuje i privlačnost prilikom parenja između mužjaka i ženki, te su se mušice prvenstveno parile sa jedinkama koje su sličnog sastava mikrobiote (Sharon i sar., 2011). Ovakav efekat mikrobiote na parenje može dovesti do divergencije linija domaćina koji se hrane različitim supstratima, što na kraju može dovesti do specijacije.

Kod *D. melanogaster*, mikrobiota ima dobro dokumentovane efekte i na somatski rast i reprodukciju (Shin i sar., 2011; Storelli i sar., 2011; Téfit i Leulier, 2017). Uticaj mikrobiote na ove osobine prouzrokovan je, barem djelimično, povećanjem efikasnosti usvajanja hranljivih materija od strane domaćina u prisustvu specifičnih članova mikrobiote. Međutim, uloga kontrole domaćina u zastupljenosti ovih potencijalno korisnih bakterija je nejasna, jer postoje indicije da bi sposobnost *D. melanogaster* da oblikuje mikrobiotu mogla biti ograničena (Wong i sar., 2013). Mikrobiološke zajednice unutar mušica razlikuju se od onih u njihovom fecesu (Blum i sar., 2013; Fink i sar., 2013), što sugerirše da postoji selekcija unutar samih jedinki. S obzirom da je model prvobitno razvijen u odnosu na mikrobiotu sisara, njegova primjenljivost na *D. melanogaster* bi stvorila zajednički okvir za razumijevanje mikrobiote kod različitih vrsta. Budući da je *D. melanogaster* jedan od najbolje razvijenih model sistema u biologiji sa mnogim prednostima u odnosu na modele sisara, i s obzirom na relativno jednostavnu mikrobiotu kojom dominiraju bakterije, primjena ovog modela na *D. melanogaster* bi u velikoj mjeri pomogla u razumijevanju interakcija domaćin-mikrobiota (Erkosar i sar., 2013; Douglas, 2018).

1.4. Teški metali kao abiotička komponenta životne sredine

Tokom prethodnih sto godina, zbog brzog rasta industrijalizacije, povećana je potražnja za eksploatacijom prirodnih resursa Zemlje, što je pogoršalo svjetski problem zagađenja životne sredine (Gautam i sar., 2016). Životna sredina je ozbiljno zagađena sa više vrsta zagađivača kao što su neorganski joni, organski zagađivači, organometalna jedinjenja, radioaktivni izotopi, gasoviti zagađivači i nanočestice (Walker i sar., 2012). Postoji diskusija u vezi sa definicijom pojma „teški metali“, budući da su elementi definisani kao teški metali ili zbog velike atomske težine ili zbog velike gustine. Danas se sintagma „teški metali“ koristi za

opisivanje metalnih hemijskih elemenata i metaloida koji su toksični za životnu sredinu i ljude. Spisak teških metala na osnovu njihove gustine koja je veća od 5 g/cm^3 i na osnovu učestalosti u svakodnevnom životu su: titanijum (Ti), vanadijum (V), hrom (Cr), mangan (Mn), gvožđe (Fe), kobalt (Co), nikl (Ni), bakar (Cu), cink (Zn), arsen (As), molibden (Mo), srebro (Ag), kadmijum (Cd), kalaj (Sn), platina (Pt), zlato (Au), živa (Hg) i olovo (Pb). Ovi teški metali se prirodno nalaze u Zemljinoj kori još od nastanka Zemlje. Zbog zapanjujućeg povećanja upotrebe teških metala, došlo je do neminovnog porasta metalnih supstanci kako u kopnenim tako i u vodenim sredinama (Gautam i sar., 2016). Zagađenje teškim metalima je nastalo usljed antropogenih aktivnosti koje su glavni uzrok zagađenja, prije svega zbog rudarstva, topionica, livnica i drugih industrija koje se baziraju na metalima, te ispiranja metala iz različitih izvora. Upotreba teških metala u poljoprivredi je sekundarni izvor zagađenja teškim metalima, usljed primjene pesticida, insekticida i đubriva. Prirodne pojave takođe mogu povećati zagađenje teškim metalima kao što su vulkanska aktivnost, korozija metala, isparavanje metala iz zemljišta i vode, erozija tla i geološko trošenje (Briffa i sar., 2020).

Metaloidi imaju tendenciju da formiraju kovalentne veze, zbog čega pokazuju toksična svojstva, a posljedica toga jeste da se mogu kovalentno vezati sa organskim grupama. Na taj način oni formiraju lipofilne jone i jedinjenja, i mogu da generišu toksične efekte kada se vezuju za nemetalne elemente ćelijskih makromolekula. Zbog toga što postaju lipofilni, distribucija metaloida u biosferi i njihovi toksični odgovori variraju u djelovanju. Teški metali mogu ući u organizam na više načina: konzumiranjem kontaminirane hrane, kontaminirane vode, udisanjem iz atmosfere i usljed kontakta sa kožom iz poljoprivrednih, farmaceutskih, proizvodnih, stambenih i industrijskih područja (Masindi i Muedi, 2018). Metali se ne mogu razgraditi i nisu biorazgradivi. Organizmi mogu da detoksikuju metalne jone tako što „sakriju“ aktivni element unutar proteina ili ih odlažu u intracelularne granule u nerastvorljivom obliku kako bi se izlučili fecesom ili za dugotrajno skladištenje. Kada se teški metali progutaju ili udahnu u organizam, oni se bioakumuliraju u našem sistemu. Zbog toga su klasifikovani kao opasni. Ova bioakumulacija izaziva biološke i fiziološke komplikacije. Neki teški metali (kao što su Fe, Cu, Mn i Zn) su neophodni za život ćelija i nazivaju se esencijalnim elementima jer su potrebni organizmu za različite biohemijske i fiziološke funkcije. Međutim, čak i oni mogu biti toksični kada su prisutni u velikim količinama.

1.4.1. Uticaj teških metala na populacije i jedinke različitih vrsta

Kada govorimo o faktorima spoljašnje sredine koji utiču na vrste i populacije organizama, svakako jedan od značajnih faktora jeste prisustvo teških metala, kao čestih polutanata u životnoj sredini. Kao posljedica antropogenog uticaja, povećava se broj staništa u kojima je količina teških metala u porastu. Nedavno je objavljeno da teški metali, kao što su As, Cd, Pb i Hg, imaju štetne efekte na raznovrsnost kopnenih beskičmenjaka u koncentracijama nižim od onih koji se smatraju bezbjednim za ljude (Monchanin i sar., 2021).

Mnoge studije su istraživale efekte metala na organizme u smislu akumulacije metala u određenim organima ili dijelovima tijela. U mikroorganizmima kao što su bakterije i gljive, pokazalo se da se metali akumuliraju na ćelijskim površinama kao precipitati, ali i da se ugrađuju u polisaharide koji oblažu ćelijske površine (Roane, 1999). Kada se unese u

organizam, visoka koncentracija teških metala može imati različite posljedice na fitness beskičmenjaka, uključujući smanjen imunski odgovor (Sun i sar., 2011), produženo vrijeme razvića (Behmer i sar., 2005) i gubitak mase (Noret i sar., 2007). Međutim, mnogi beskičmenjaci su razvili toleranciju na metale ili neke mehanizme detoksikacije (Janssens i sar., 2009). Neki beskičmenjaci izlučuju metale u fecesu, ograničavajući njihovo usvajanje i samim tim smanjujući transfer metala na više trofičke nivoe (Gall i sar., 2015). Neki beskičmenjaci mogu da progutaju metale sadržane u zemljištu i biljkama ili, kada su u direktnom kontaktu sa metalima, mogu da ih apsorbuju kroz svoje egzoskelete ili druge tjelesne pokrivače. Kod izopoda, metali se prvenstveno akumuliraju u hepatopankreasu, organu digestivnog trakta analognom kombinovanoj jetri i pankreasu. Kod kišnih glista (*Lumbricus terrestris*), mjesto preferencijalne akumulacije metala je zadnji probavni kanal ili tačnije tkivo koje okružuje digestivni trakt i ima sličnu funkciju kao jetra (Hodson, 2013). Slične akumulacije metala su dobro proučavane u još nekim taksonomskim grupama, uključujući mekušce (Bourioug i sar., 2015), pravokrilce (Devkota i Schmidt, 2000), koleoptere (Migula i sar., 2011) i mrave (Grześ, 2010). Međutim, neki taksoni će akumulirati više metala od drugih ukoliko su u direktnom kontaktu sa njima, poput beskičmenjaka koji žive u zemljištu, ili ako konzumiraju hranu bogatu metalima, kao što su biljke, detritusi ili životinje koje sadrže visoke koncentracije metala. Čak i kada su organizmi u direktnom kontaktu sa metalima, odgovori u vidu promjene ponašanja mogu ograničiti akumulaciju metala u tkivima beskičmenjaka. Nekoliko studija pokazuje da, nakon što su probali biljni materijal bogat metalima, beskičmenjaci herbivori su razvili averziju i smanjili stopu ingestije tog biljnog materijala (Behmer i sar., 2005). Metali takođe mogu da utiču na interakcije između biljaka i oprašivača, pri čemu su oprašivači koji posjećuju biljke koje rastu na kontaminiranom zemljištu u opasnosti od unošenja potencijalno toksičnih metala. Subletalni nivo olova utiče i na ponašanje medonosnih pčela (*A. mellifera*), pri čemu radilice skraćuju vrijeme posjete cvjetovima suncokreta koji se gaje na zemljištu zagađenom olovom, i pri tome ne mogu da razlikuju cvjetove gajene na kontaminiranom i nekontaminiranom zemljištu prije posjete cvijetu, što ukazuje na još jedan mogući put bioakumulacije olova u pčelama (Sivakoff i Gardiner, 2017). Studija Meindl i Ashman (2013) je pokazala da nektar obogaćen metalima može da promijeni ponašanje bumbara (*Bombus sp.*) u potrazi za hranom, što sugerise da se metali ili metaloidi, poput selena (Se), nalaze u polenu i nektaru i mogu negativno uticati na oprašivače u kontaminiranom okruženju. Iako postoje brojna istraživanja o transferu metala između biljaka i beskičmenjaka, kao i beskičmenjaka i zemljišta, manje studija je ispitivalo potencijal za transfer metala između samih beskičmenjaka. Green i sar. (2010) su uočili prenos Cd i Zn iz zemljišta sa kanalizacionim muljem kroz lanac ishrane od pšenice (*Triticum aestivum*) preko afida (*Sitobion avenae*) do bubamara (*Coccinella septempunctata*). Slično tome, u istraživanju biljke *Alyssum pintodalsilvae*, koja je hiperakumulator Ni, uočen je prenos Ni sa skakavaca i sličnih beskičmenjaka na paukove (Peterson i sar., 2003). Ove studije pokazuju da se metali mogu prenositi između beskičmenjaka, međutim, buduća istraživanja bi trebalo da se fokusiraju na takve transfere, pošto metali mogu da predstavljaju rizik za beskičmenjake kretanjem kroz mreže ishrane i nakon što su izvori zagađenja metalom uklonjeni (Gall i sar., 2015).

U istraživanju Al-Momani i Massadeh (2005) pronađeno je da sintetički supstrat sa teškim metalima Cd, Cu, Pb i Zn do 100 ppm, nema značajnog uticaja na metamorfozu larve u lutku

kod *D. melanogaster*. Ovo bi moglo biti posljedica njihove sposobnosti da skladište ili detoksikuju ove teške metale u pojedinim dijelovima tijela kada su prisutni u niskim koncentracijama (Ballan-Dufrançais, 2002). Visoka koncentracija teških metala iznad 500 ppm potencijalno ometa enzime koji su neophodni za proizvodnju hormona za metamorfozu insekata. Smanjenje veličine odraslih jedinki, uključujući i krila, može biti rezultat uticaja ovih toksičnih teških metala na odgovorne hormone ili aktivnost metaboličkih enzima i ekspresiju gena (Al-Momani i Massadeh, 2005). Kroz procjenu uticaja izloženosti Cd i Hg na *D. melanogaster*, identificirano je nekoliko značajnih efekata teških metala na dužinu razvića i mortalitet koji predstavljaju dobre parametre za analizu hronične toksičnosti umjerenih i visokih koncentracija teških metala. Sa druge strane, ekspresija gena se pokazala obećavajućom za analizu niskih koncentracija teških metala, blizu ekoloških regulatornih vrijednosti za otpadne vode. Pored toga, dok je Hg djelovao toksičnije od Cd, mješavine niskih koncentracija oba metala su imale jači efekat na *D. melanogaster* u poređenju sa jednokratnim izlaganjem jednom od metala. Ovaj fenomen se pripisuje sinergističkom efektu zajedničkog izlaganja stresoru (Frat i sar., 2021).

Olovo je jedan od široko rasprostranjenih teških metala u prirodi i ranije je uočeno da ima izražen negativan uticaj na fitnes vrste *D. subobscura* (Kalajdzic i sar., 2015), kao i da smanjuje veličinu krila i da su njegovi štetni efekti izraženiji kod jedinki koje imaju visok nivo inbridinga, što ukazuje na sinergistički efekat genetičkog i ekološkog stresa (Tanasković i sar., 2016). Takođe je pokazano da se njegov negativan uticaj može modifikovati u zavisnosti od populacionog porijekla (Kenig i sar., 2013), heterozigotnosti genoma (Tanasković i sar., 2015) ili genetičke varijabilnosti (Zhou i sar., 2017). Kod *D. melanogaster* je pokazano da postoje različiti homeostatski i antioksidativni mehanizmi za odbranu od teških metala. Na primjer, antioksidativni enzim, superoksid dismutaza (SOD)-1, igra ključnu ulogu u odbrani *D. melanogaster* od toksičnosti gvožđa, pri čemu se utišavanjem gena za ovaj enzim značajno skraćuje životni vijek odraslih jedinki na medijumu sa dodatkom gvožđa (Bahadorani i sar., 2010). Pored toga, postoje metalni homeostatski proteini kao što su metalotionini, metalni transporteri i metalni šaperoni, koji igraju ključnu ulogu u odbrani organizma od toksičnosti teških metala. Generalno, poremećaj homeostatskih mehanizama za metale može imati ozbiljne posljedice na vrste roda *Drosophila* i dovesti do rane smrti. Ranije studije ilustruju da prekinuta ekspresija metalotionina značajno povećava osjetljivost larvi i odraslih jedinki na toksičnost teških metala i skraćuje životni vijek odraslih mušica. Ovi rezultati ukazuju na to da zbog njihove suštinske uloge kao mikronutrijenata sa jedne strane, i njihove toksične prirode sa druge strane, homeostaza teških metala u organizmu mora da se održava pažljivim unosom, distribucijom, skladištenjem i izlučivanjem. Bahadorani i Hilliker (2009) ilustruju da je izbjegavanje ekstremnih koncentracija teških metala kod *D. melanogaster*, još jedan efikasan odbrambeni mehanizam u prisustvu izvora hrane kontaminirane metalima. Tendencija *D. melanogaster* da polaže manje jaja na supstratu sa visokim sadržajem metala može u velikoj mjeri da poboljša adaptaciju i opstanak jedinki u prirodnim uslovima.

Mikrobiota crijeva je ključna za ograničavanje unosa i difuzije teških metala zbog svoje uloge u apsorpciji i metabolizmu teških metala. Na primjer, biološki poluživot Hg kod čovjeka se razlikuje od onog kod glodara, što se djelimično može pripisati razlici u mikrobioti između ovih vrsta (Rothenberg i sar., 2016), stoga je neophodno uzeti u obzir specifičnosti mikrobiote crijeva domaćina prilikom procjene rizika od oralne izloženosti teškim metalima. Nekoliko

studija je istraživalo ulogu mikrobiote crijeva u apsorpciji teških metala pomoću miševa tretiranih antibioticima i miševa bez mikroorganizama. Rezultati su pokazali da miševi tretirani antibioticima ili miševi bez mikroorganizama izlučuju značajno manje Cd, Pb, metil-Hg i As u svom fecesu i akumuliraju veće koncentracije teških metala u krvi i tkivima u poređenju sa kontrolnim miševima, što ukazuje da je mikrobiota crijeva zaista ključna za smanjenje apsorpcije i akumulacije teških metala (Rowland i sar., 1984; Breton i sar., 2013; Coryell i sar., 2018). Mikrobiota crijeva može bioakumulirati teške metale ili ih transformisati putem različitih enzimskih reakcija, čime se olakšava izlučivanje teških metala i smanjuje izloženost organizma istim (Dey i sar., 2016).

Izloženost teškim metalima, zagađivačima vazduha, nanočesticama i endokrinim disruptorima može dovesti do promjena u crijevnoj mikrobioti kod različitih taksona domaćina. Dosadašnji podaci ipak ne pružaju jasne obrasce o tome da li su određene bakterije posebno osjetljive na niz izlaganja toksičnim hemikalijama. Vjerovatno je da specifično jedinjenje, doza, razvojni stadijum i trajanje izlaganja, izazivaju različite efekte na mikrobiotu domaćina. Izloženost tokom perinatalnog perioda, kada mikroorganizmi počinju da kolonizuju crijeva, vjerovatno će izazvati trajnije efekte od sličnog izlaganja u odraslom dobu. Pored toga, izloženost nekim hemikalijama može da oponaša promjene mikrobiote crijeva domaćina, kakve se primjećuju i kod drugih poremećaja životne sredine. Na primjer, izloženost bisfenolu A i konzumiranje hrane sa visokim procentom masti dovode do sličnih bakterijskih poremećaja kod miševa koji su bili podvrgnuti nekom od ovih tretmana (Lai i sar., 2016).

2. Ciljevi istraživanja

Prvi cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi diverzitet bakterijskih zajednica povezanih sa vrstama roda *Drosophila* u populacijama sa različitih staništa, kao i značaj promjena faktora spoljašnje sredine, kao što je zagađenje olovom, na promjenu tog diverziteta.

Drugi cilj je bio da se nakon utvrđivanja razlika u diverzitetu mikrobiote među ovim vrstama i populacijama, ispita uticaj promjena u sastavu mikrobiote na osobine njihove životne istorije u eksperimentalnim uslovima, sa i bez zagađenja olovom.

Istraživanje je obuhvatilo jedinke iz prirode i eksperimentalne populacije sa vrstama *D. melanogaster*, koja je kosmopolitska, najbolje proučena model vrsta, i *D. subobscura*, kao Palearktička vrsta, koja je uspješno, za nekoliko decenija, proširila svoj areal na druge kontinente i povećala raznovrsnost staništa koja naseljava, a smatra se i pouzdanim modelom za praćenje klimatskih promjena i adaptacija zahvaljujući bogatom hromozomskom polimorfizmu.

U skladu sa opštim ciljevima, postavljeni su specifični ciljevi:

1. Utvrditi sastav mikrobiote kod *D. melanogaster* i *D. subobscura* uzorkovanih sa različitih lokaliteta iz prirode i njihovog direktnog potomstva u laboratorijskim uslovima primjenom kultivabilnih i nekultivabilnih metoda.
2. Ispitati promjene u sastavu mikrobiote kod oba pola, dvije populacije *D. melanogaster* i *D. subobscura* gajenih u eksperimentalnim uslovima na standardnom supstratu i supstratu sa dodatim olovo-acetatom nakon više generacija.
3. Ispitati uticaj promjena u sastavu mikrobiote na osobine životne istorije (dužinu razvića i preživljavanje od jaja do adulta) kod *D. melanogaster* i *D. subobscura*, uzgajanjem na supstratu sa dodatim olovo-acetatom, a u zavisnosti od vrste, populacionog porijekla i pola jedinki.

3. Materijal i metode

3.1. Vrste i lokalitet

U ovom istraživanju su korišćene populacije dvije vrste insekata roda *Drosophila*, red Diptera, porodica Drosophilidae, i to *D. melanogaster* i *D. subobscura* (Tabela 1).

D. melanogaster, iz podroda *Sophophora*, je vrsta koja naseljava sve kontinente osim Antarktika. Prije oko 15.000 godina, *D. melanogaster* je migrirala iz Subsaharske Afrike u Evropu i potom kolonizovala veći dio ostatka svijeta (David i Capy, 1988; Lachaise i sar., 1988). Pošto je disperzija iz tropskog regiona zahtijevala preživljavanje u staništima sa umjerenom klimom, *D. melanogaster* je pogodan model za proučavanje adaptacije na nova okruženja sa aspekta populacione genomike (Hales i sar., 2015; Kapun i sar., 2021).

D. subobscura je Palearktička vrsta *obscura* podgrupe, takođe iz podroda *Sophophora*, koja je endemična vrsta širom Evrope (osim u centralnoj i sjevernoj Skandinaviji), kao i na Bliskom istoku, u sjevernoj Africi i na atlantskim ostrvima Madeira, Azorska i Kanarska ostrva. *D. subobscura* je omiljena vrsta evropskih genetičara i evolucionih biologa koji rade sa prirodnim populacijama *Drosophila*. Više od pola vijeka istraživanja od strane brojnih istraživača u laboratorijama širom svijeta, donijela su značajna saznanja o biogeografiji, ekologiji, ponašanju, citogenetici, populacionoj genetici i evolucionoj biologiji *D. subobscura* (Stamenković-Radak, 2015). Pored navedenog, *D. subobscura* je vrsta koja se naglo, prije pet decenija, proširila duž Sjeverne i Južne Amerike i koja se uzima kao pouzdani model za praćenje klimatskih promjena preko genetičkog polimorfizma jer se učestalosti pojedinih genetičkih markera u populacijama ove vrste mijenjaju veoma brzo kao odgovor na promjenu sredine.

Tabela 1. Lokacije uzorkovanja vrsta *D. melanogaster* i *D. subobscura* i eksperimenti u kojima su korišćene.

Eksperiment	Uzorci
<u>Priroda/lab eksperiment</u> Poređenje diverziteta mikrobiote prirodnih i laboratorijskih populacija dvije vrste sa različitih lokaliteta, metodom sa kultivacijom i nezavisno od kultivacije	<i>D. melanogaster</i> – Kalna <i>D. subobscura</i> – Mitrovac
<u>Standard/olovo F13 eksperiment</u> Poređenje diverziteta mikrobiote laboratorijskih populacija sa standardnog supstrata i supstrata sa povišenom koncentracijom olovo-acetata nakon 13 generacija dvije vrste sa istog lokaliteta	<i>D. melanogaster</i> – Kalna <i>D. subobscura</i> – Kalna

<p><u>Standard/olovo F35 eksperiment</u></p> <p>Poređenje diverziteta mikrobiote i komponenti životne istorije laboratorijskih populacija sa standardnog supstrata i supstrata sa povišenom koncentracijom olovo-acetata nakon 35 generacija, kod dvije vrste, obje sa dva lokaliteta</p>	<p><i>D. melanogaster</i> – Kalna i Slankamen <i>D. subobscura</i> – Kalna i Slankamen</p>
---	---

Za poređenje sastava mikrobiote između prirodnih populacija i onih uzgajanih u laboratoriji, korišćeni su uzorci vrste *D. melanogaster* iz Kalne, Srbija i *D. subobscura* iz Mitrovca na Tari, Srbija. U istraživanjima u kojima je poređen sastav mikrobiote i osobine životne istorije kod jedinki uzgajanih u laboratoriji i nakon više generacija na supstratu sa teškim metalima, za obje vrste su korišćene populacije iz Kalne i Slankamena.

Kalna (43° 42' 17" N, 22° 41' 59" E) je naselje u opštini Knjaževac u Zaječarskom okrugu i nalazi se na obroncima Stare planine. Stara planina je dio kompleksa planine Balkan čiji se manji zapadni dio nalazi u Srbiji. Rijeke koje su prisutne na planinskom masivu Stare planine su Trgoviški Timok, Visočica, Beli Timok i Toplodolska rijeka. Najviši vrh Stare planine u Srbiji je Midžor (2169 m.n.v.). U prošlosti je na teritoriji Stare planine kod naselja Kalna pronađen uranijum i 1963. godine je otvoren rudnik „Grabovica“. Rad rudnika je obustavljen 1965. godine, ali se u uskom pojasu oko rudnika „Grabovica“ i dalje uočava povišena prirodna radioaktivnost (Nikolov i sar., 2014). Uzorci mušica su sakupljeni na obodu listopadne šume, kraj voćnjaka.

Mitrovac na Tari (43° 92' 17" N, 19° 42' 39" E) se nalazi unutar Nacionalnog parka na planini Tari u opštini Bajina Bašta. Planinski masiv Tare se nalazi u zapadnoj Srbiji i u svom sjeverozapadnom dijelu je ograničen dubokim kanjonom rijeke Drine, dok mu se obronci spuštaju ka dolini rijeke Đetinje, gdje se oslanja na obronke planine Zlatibor. Mitrovac je jedna od najvećih visoravni Tare i nalazi se na oko 1080 m.n.v. Planina Tara je uglavnom krečnjačkog sastava i relativno je siromašna površinskim vodama, ali je bogata šumskim zajednicama sa brojnim zaštićenim endemskim vrstama. Uzorci su sakupljeni u četinarskoj šumi.

Slankamen (45° 14' 15" N, 20° 25' 86" E) se nalazi u sjeveroistočnom dijelu Srema i predstavlja najstarije naselje indijske opštine. On se nalazi na ušću Tise u Dunav, u podnožju Fruške gore, na 80 m nadmorske visine, a smješten je 55 km sjeverozapadno od Beograda. Okolina Slankamena, gdje su jedinke uzorkovane, obiluje vinogradima i voćnjacima.

3.2. Opšti uslovi održavanja

Svi uzorci su sakupljeni na isti način. Korišćeni su atrakanti sa fermentisanim jabukama, gdje su mušice sakupljane pomoću entomološke mreže na svakih 20 minuta u periodu od 18 do 20 časova. Uzorci su razdvajani po polovima i mužjaci su odmah zamrzavani u 96% etanol na -20 °C. Pojedinačne ženke koje su oplodene u prirodi su korišćene za uspostavljanje laboratorijskih linija (engl. *iso-female*, IF). Ženke su postavljene u flakone zapremine 50 mL sa 15 mL supstrata da polažu jaja i nakon 10 dana su uklonjene iz flakona. Sve mušice su

održavane u istim laboratorijskim uslovima na temperaturi od $19 \pm 0,5$ °C, sa svjetlosnim ciklusom 12 časova svjetlost-12 časova mrak i pri relativnoj vlažnosti vazduha od oko 60%. Standardni supstrat za održavanje *Drosophila* u laboratoriji na 2,2 L vode sadrži 208 g kukuruznog griza, 188 g šećera, 14 g agara, 40 g suvog kvasca i 5 g fungicida (alkoholni rastvor metil-4-hidroksibenzoata (Nipagin®)), koji je rastvoren u 60 mL 96% etanola. Obje vrste su održavane na 19 °C, iako vrsta *D. melanogaster* može da podnese širok dijapazon variranja temperatura i uspješno se uzgaja na 19-25 °C. Međutim, vrsta *D. subobscura* toleriše znatno uži dijapazon variranja temperatura, pri čemu je 19 °C optimalno. Obje vrste se uspješno razvijaju na 19 °C, a što je još važnije zbog ispitivanja mikrobiote, održavane su jednak broj dana pod istim uslovima. Takođe, budući da vrsta *D. subobscura* rijetko polaže jaja bez prisustva kvasca, suvi kvasac je dodat na površinu supstrata kod obje vrste.

Za ispitivanje uticaja teških metala na sastav mikrobiote i osobine životne istorije kod *Drosophila*, korišćen je supstrat sa povišenom koncentracijom olovo-acetata ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i to 1000 µg/mL (u radu dalje označen je kao C3), dok je standardni (kontrolni) supstrat označen dalje u radu kao St (Tabela 2).

Tabela 2. Lista skraćenica koje su korišćene prilikom označavanja uzoraka.

Pojam	Skraćenica
<i>D. melanogaster</i>	Dmel
<i>D. subobscura</i>	Dsub
Populacija iz prirode	Wild
Populacija iz laboratorije	Lab
Populacija Kalna	K
Populacija Slankamen	Sl
Standardni (kontrolni) supstrat	St
Supstrat sa 1000 µg/mL olovo-acetata	C3
Mužjaci	M
Ženke	F
Larve	L

3.3. Poređenje sastava mikrobiote između prirodnih i laboratorijskih populacija

Za poređenje sastava mikrobiote između prirodnih i laboratorijskih populacija, korišćene su jedinke vrste *D. melanogaster* iz Kalne i *D. subobscura* iz Mitrovca. Mužjaci iz prirode su odmah po sakupljanju pohranjeni u 96% etanol na -20 °C, dok su ženke iskorišćene za uspostavljanje IF laboratorijskih linija. Nakon 10 generacija provedenih u laboratoriji, slučajnim odabirom su sakupljeni mužjaci i larve trećeg stupnja, starosti pet do sedam dana od polaganja jaja za obje vrste, i pohranjeni u 96% etanol na -20 °C za NGS sekvenciranje i u 10 mM MgSO_4 za uzgajanje u kulturi. Korišćenjem različitih medija za rast i izolacijom bakterija iz larvi i odraslih jedinki, dobijeni su izolati koji su identifikovani sekvenciranjem gena za 16S rDNK. Da bi se uporedili uzorci iz prirode sa onim uzgajanim u laboratoriji, korišćena je i metoda nezavisna od kulture i diverzitet je određen *MiSeq Illumina* NGS sekvenciranjem V3-V4 varijabilnog regiona bakterijskog gena za 16S rRNK.

3.4. Utvrđivanje sastava mikrobiote kod *D. melanogaster* i *D. subobscura* metodom zasnovanom na kulturi bakterija

Pri ispitivanju mogućnosti korišćenja metode zasnovane na kulturi bakterija za utvrđivanje sastava mikrobiote kod *D. melanogaster* i *D. subobscura*, uzorkovano je deset larvi trećeg stupnja i deset odraslih jedinki starih sedam dana po liniji obje vrste *Drosophila* i pohranjeno u 10 mM MgSO₄ na -20 °C.

3.4.1. Kultivacija i izolacija bakterija

Prije izolacije bakterija, uzorci su ultrazvučno tretirani u vodenom kupatilu 5 minuta i snažno vorteksovani. Bakterije su izolovane postavljanjem 100 µL koncentrovanog rastvora odraslih jedinki i larvi u MgSO₄, na četiri različite vrste podloga za rast: *Luria-Bertani* (LA) agar (*Difco*, SAD) (10 g triptona, 5 g ekstrakta kvasca, 5 g NaCl, 15 g agara); minimalni agar (MM) (10,5 g K₂HPO₄, 4,5 g KH₂PO₄, 1 g (NH₄)SO₄, 0,42 g Na-citrata × 2H₂O, 0,5 mL 20% MgSO₄, 0,4 mL tiamina (5 mg/mL), 5 mL 40% glukoze, 15 g agara); *De Man, Rogosa* i *Sharpe* (MRS) agar (*Lab M*, UK) i GYC agar (50 g glukoze, 10 g ekstrakt kvasca, 20 g CaCO₃, 20 g agara) (po litru). Nakon inkubacije na 25 °C tokom dva do sedam dana, dobijene su čiste bakterijske kulture. Izolati su pohranjeni u *Luria-Bertani* bujonu (LB) sa 30% glicerola i čuvani na -20 °C do dalje upotrebe.

3.4.2. Molekularna identifikacija bakterijskih izolata

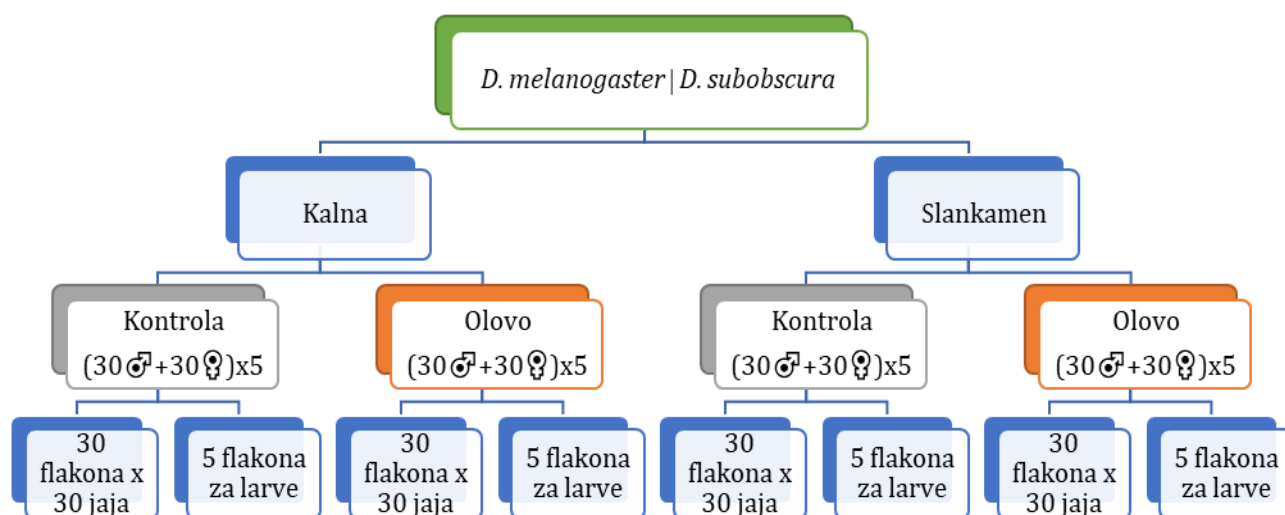
Ukupna DNK je ekstrahovana pomoću *Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Kit* (*Zymo Research*, SAD), prateći uputstva proizvođača. Amplifikacija gena za 16S rRNK je izvedena korišćenjem prajmera 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') i 1523R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3'), prema Lalevic i sar. (2012). PCR reakcija je izvedena u reakcionoj smjesi od 30 µL koja sadrži 19,65 µL PCR vode bez nukleaza (*Gibco*, UK), 3 µL 10 × *KAPA Taq* pufera (*KAPA Biosystems*, SAD), 2,4 µL 25 mM MgCl₂, 0,9 µL 10 mM dNTP miksa, 0,15 µL *KAPA Taq* DNK polimeraze (5 U/µL), 1,2 µL svakog prajmera (10 µM) i 1,5 µL DNK. PCR uslovi za amplifikaciju željenog gena su bili sljedeći: jedan ciklus početne denaturacije na 95 °C u trajanju od 5 minuta, praćen sa 33 ciklusa denaturacije (na 95 °C tokom 1 minuta), vezivanje prajmera (na 50 °C tokom 1 minuta) i elongacija (na 72 °C tokom 1 minuta) i jedan finalni korak elongacije na 72 °C tokom 7 min. PCR amplifikati su prečišćeni korišćenjem *QIAquick PCR Purification Kit/250* i *QIAquick Gel Extraction Kit/250* (*QIAGEN GmbH*, Hilden, Njemačka) i sekvenciranje je izvršeno od strane *Macrogen* firme (Holandija). Da bi se identifikovali izolati, dobijene sekvence su upoređene sa sekvenciranim genima deponovanim u bazi podataka NCBI *GenBank* koristeći BLAST alat za pretragu. Sekvence su poravnate pomoću *CLUSTAL W* i ručno uređene pomoću softvera *BioEdit 7.2.6*. Analiza filogenetskih sekvenci i konstrukcija *Neighbor-joining* dendrograma je izvršena u programu MEGA 7.

3.5. Poređenje sastava mikrobiote kod jedinki uzgajanih u laboratoriji i na supstratu sa teškim metalima

Za poređenje sastava mikrobiote kod jedinki uzgajanih u laboratoriji i nakon više generacija na supstratu sa teškim metalima, korišćene su jedinke vrste *D. melanogaster* i *D. subobscura* iz populacije Kalna. Jedinke su održavane u standardnim laboratorijskim uslovima više generacija, i to *D. subobscura* 45 generacija i *D. melanogaster* 30 generacija. Nakon toga, 9 parova mušica iz svake od 10 slučajno izabranih IF linija su prebačeni u teglice zapremine 240 mL sa 40 mL supstrata sa dodatim olovo-acetatom (C3) i standardnog supstrata (St). Mušice su se parile saedam dana na supstratima, nakon čega su zamrznute u 96% etanolu na -20 °C za dalju analizu. Njihovo potomstvo je održavano na olovnom i standardnom supstratu narednih 13 generacija, pod istim uslovima i u kontrolisanoj gustini populacije (20 slučajnih parova po svakoj teglici). Nakon 13 generacija, uzorci potomstva su takođe zamrznuti u 96% etanolu na -20 °C za analizu mikrobiote.

3.6. Ispitivanje uticaja sastava mikrobiote i prisustva teških metala na osobine životne istorije

Prethodno uspostavljene laboratorijske populacije su održavane ukupno 35 generacija na supstratu sa povećanom koncentracijom olova, a uporedo sa tim i na standardnom supstratu. Da bi se ispitaio uticaja sastava mikrobiote i prisustva teških metala na osobine životne istorije, postavljen je sljedeći eksperiment (Šema 1).



Šema 1. Eksperimentalna postavka pri ispitivanju uticaja sastava mikrobiote i prisustva teških metala na osobine životne istorije.

Uzeto je 30 parova mušica po teglici zapremine 240 mL sa 40 mL supstrata, i ostavljene su da se pare pet dana, nakon čega su uklonjene iz teglice. Po izlijeganju, nevini mužjaci i ženke su sakupljani na svakih 12 časova kod *D. melanogaster* i 24 časa kod *D. subobscura* i razdvajani po polovima. Teglice sa *D. subobscura* su dodatno držane u mraku kako bi se spriječilo parenje nevinih jedinki. Kada je sakupljeno 150 mužjaka i 150 ženki iz svake grupe, po 30 mužjaka i 30 ženki po teglici (ukupno pet teglica po grupi) su ostavljeni da se pare tri dana. Po isteku tri dana, na teglice su stavljene Petri posude sa malom količinom supstrata na koji je dodat tečni kvasac (suvi kvasac rastvoren u destilovanoj vodi). Teglice su potom okrenute na Petri posude kako bi se omogućilo polaganje jaja. Jaja su sakupljana na svakih osam časova i prebacivana u 50 mL flakone sa 15 mL supstrata uz dodatak jedne do dvije kapi tečnog kvasca na površinu. Za svaku grupu je sakupljeno po 30 flakona sa po 30 jaja, dok je dodatnih pet flakona po grupi sakupljeno za uzorkovanje larvi. Larve su uzorkovane pet do sedam dana nakon polaganja jaja za obje vrste. Od početka izlijeganja F1 generacije, sakupljane su jedinke na svaka 24 časa sve dok u periodu od 72 časa nije bilo novih jedinki. Sakupljene jedinke su razdvojene po polovima i pohranjene u 96% etanol na -20 °C za dalju analizu.

3.7. Određivanje sadržaja olova i drugih makro- i mikroelemenata ICP-OES metodom

Da bi se utvrdilo koliko je olovo nakon višegeneracijskog gajenja prisutno u samim jedinkama, kao i da li se po tome razlikuju međusobno vrste i polovi, jedinke iz eksperimenta ispitivanja uticaja sastava mikrobiote i prisustva teških metala na osobine životne istorije su analizirane na koncentracije olova i drugih makro- i mikroelemenata. Za analizu su sakupljene izležene jedinke obje vrste i oba pola odvojeno sa kontrolnog i olovnog supstrata što je činilo 8 uzoraka od po više stotina jedinki jer je za analizu bilo potrebno da se sakupi 1 gram mušica. One su čuvane u suvim praznim flakonima na -20 °C do analize. S obzirom da su eksperimentalne grupe obje populacije i obje vrste održavane pod istim uslovima, i da ne očekujemo unutar-specijske razlike, za ovu analizu korišćena je samo populacija iz Kalne.

Sadržaj olova, kao i drugih mikro- i makroelemenata je određen optičkom emisionom spektrometrijom sa induktivno spregnutom plazmom (engl. *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-OES) (*Thermo Scientific iCAP 6500 Duo ICP*, *Thermo Fisher Scientific*, Kembridž, UK). Analiza je izvršena u Institutu za opštu i fizičku hemiju u Beogradu.

Razgradnja uzoraka *D. melanogaster* i *D. subobscura* je najprije izvršena na *Advanced Microwave Digestion System (ETHOS 1, Milestone, Italija)* upotrebom HPR-1000/10S segmentnog rotora visokog pritiska. Korišćene su PTFE posudice otporne na pritisak (zapremine 100 mL) koje su imale QS-50 kvarcne umetke. Odvagano je 0,5 g±0,1 mg svakog uzorka, postavljeni su u kvarcne umetke i pomiješani sa 5 mL HNO₃ (65 wt.%, *Suprapur®*, *Merck KGaA, Darmstadt*, Njemačka). Temperatura je postepeno povećavana sa mikrotalasnom energijom do 200 °C u prvih 10 minuta, ostavljena na toj temperaturi 20 minuta, a zatim je brzo spuštena na sobnu temperaturu. Nakon hlađenja, rastvor je razblažen do fiksne zapremine (25 mL) sa ultračistom vodom. Ultračista voda sa provodljivošću od 0,05 µS/cm je pripremljena upotrebom *Barnstead™ GenPure™ Pro (Thermo Scientific, Njemačka)*.

Rastvori za eksternu kalibraciju su napravljeni od sertifikovanog standardnog rastvora: *Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure®*, 1000 µg/ml (*Alfa Aesar GmbH & Co KG*,

Njemačka) i *SS-Low Level Elements ICV Stock* (VHG Labs, Inc - dio standarda LGC, Mančester, SAD). Kontrola kvaliteta je sprovedena korišćenjem referentnih uzoraka, kalibracionih rastvora usklađenih sa matricom i trostrukom analizom svakog uzorka. Pouzdanost mjerenja je potvrđena relativnom standardnom devijacijom (RSD<1%). Analitička kontrola kvaliteta procesa je izvršena korišćenjem sertifikovanog referentnog materijala (engl. *certified reference material*, CRM) ribljeg proteina za metale u tragovima DORM 4 (*National Research Council Canada* (NRCC), Otava, Kanada). Pouzdanost izmjerenih koncentracija sa sertifikovanim vrijednostima je iznosila 97-103%. Koncentracije elemenata u uzorcima su izražene u µg/g.

3.8. Izolacija DNK i metagenomska analiza

U eksperimentu Priroda/lab su korišćena četiri uzorka, a ukupna DNK je izolovana iz po 30 mužjaka kod obje vrste i iz obje sredine. Uzorci su obilježeni kao: *Dmel_Wild*, *Dmel_Lab*, *Dsub_Wild* i *Dsub_Lab*. DNK izolacija je urađena prema modifikovanom protokolu Martinez i sar. (1992). Uzorci su homogenizovani pomoću ručnog homogenizatora u 1,5 mL Ependorf tubici (dvije tubice sa po 15 uzoraka) u 320 µL 10 mM rastvora Tris HCl, 60 mM rastvora NaCl, 5% saharoze i 10 mM rastvora EDTA pri pH od 7,8. Nakon toga je dodato 400 µL 1,25% rastvora sodijum dodecil sulfata (SDS), 300 mM rastvora Tris HCl, 5% saharoze i 10 mM rastvora EDTA, pri pH od 9,0 i lagano je promućkano. Smješa je inkubirana 30 minuta na 65 °C, nakon čega je dodato 120 µL 3 M kalijum acetata, pH vrijednosti 4,8, i ostavljeno je u zamrzivač na 15 minuta. Po završetku inkubacije, uzorci su centrifugirani pri brzini od 14.650 rpm i sakupljen je supernatant. Dodata je jedna zapremina izopropanola i nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi, smješa je centrifugirana 5 minuta pri istoj brzini kako bi se dobio DNK talog. Dobijeni talog je ispran sa 70% etanolom, centrifugiran još jednom pri brzini od 14.650 rpm tokom 2,5 minuta i odbačen je supernatant. Talozi su sušeni 30 minuta na sobnoj temperaturi i nakon toga su rastvoreni u 100 µL vode bez nukleaza. Ukupna koncentracija DNK u dobijenim uzorcima je utvrđena na uređaju *NanoPhotometer® N60* (IMPLEN, CA, SAD). Sekvenciranje je izvršeno od strane *Macrogen* firme (Holandija).

U eksperimentu Standard/olovo F13, korišćeno je 16 uzoraka (dvije vrste x dvije generacije x dva supstrata x dva pola) sa po 10 jedinki. Uzorci su podijeljeni na roditeljsku i potomačku generaciju i obilježeni su na sljedeći način: *Dmel_St_F*, *Dmel_C3_F*, *Dmel_St_M*, *Dmel_C3_M*, *Dsub_St_F*, *Dsub_C3_F*, *Dsub_St_M* i *Dsub_C3_M*. Izolacija DNK je urađena prema modifikovanom protokolu Kapun i sar. (2020). Uzorci su i u ovom slučaju homogenizovani pomoću ručnog homogenizatora u 1,5 mL Ependorf tubici u 200 µL rastvora A (smješa 1M rastvora Tris HCl pri pH od 9; 0,5 M rastvora EDTA pri pH od 8 i 1% rastvora SDS). Nakon toga, dodata su 3 µL rastvora proteinaze K (20 mg/mL), uzorci su vorteksovani i inkubirani tri puta uzastopno i to: 30 minuta na 56 °C, 30 minuta na 70 °C i nekoliko minuta na 37 °C. Po završetku inkubacije, dodata su 2 µL RNaze A (10 mg/mL) i uzorci su inkubirani 30 minuta na 37 °C. Nakon toga je u smještu dodato 28 µL 8 M rastvora kalijum acetata i uzorci su stavljeni na inkubaciju u zamrzivač tokom 30 minuta, po čijem isteku su centrifugirani 15 minuta pri brzini od 13.000 rpm. Sakupljen je supernatant, u njega je dodata jedna zapremina fenol:hloroform:izoamil alkohola (25:24:1) i uzorci su stavljeni 5 minuta na centrifugu pri

brzini od 13.000 rpm. Supernatant je ponovo sakupljen i prethodni korak je ponovljen sa 0,75 zapremine čistog hloroforma. U sljedećem koraku su dodate 2,5 zapremine 95% ledenog etanola i uzorci su stavljeni 5 minuta na centrifugu pri brzini od 10.000 rpm kako bi se dobili DNK talozi. Dobijeni talozi su isprani sa 1 mL 70% etanola, centrifugirani 5 minuta pri brzini od 13.000 rpm i supernatant je odbačen. Talozi su sušeni 30 minuta na sobnoj temperaturi i rastvoreni u 50 µL TE pufera (10 mM rastvor Tris HCl i 1 mM rastvor EDTA). Ukupna koncentracija DNK u dobijenim uzorcima je utvrđena na uređaju *NanoPhotometer® N60* (IMPLEN, CA, SAD). Sekvenciranje je izvršeno od strane *Fisabio* firme (Španija).

U eksperimentu Standard/olovo F35, korišćena su ukupno 24 uzorka, od čega su njih 16 bili adulti (dvije vrste x dvije populacije x dva supstrata x dva pola) i osam uzoraka larvi trećeg stupnja (dvije vrste x dvije populacije x dva supstrata) (Tabela 3).

Tabela 3. Uzorci koji su korišćeni u eksperimentu Standard/olovo F35.

	Adulti		Larve	
	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. subobscura</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. subobscura</i>
Standardni supstrat	Dmel_K_St_M	Dsub_K_St_M	Dmel_K_St_L	Dsub_K_St_L
	Dmel_K_St_F	Dsub_K_St_F		
	Dmel_Sl_St_M	Dsub_Sl_St_M	Dmel_Sl_St_L	Dsub_Sl_St_L
	Dmel_Sl_St_F	Dsub_Sl_St_F		
Olovni supstrat	Dmel_K_C3_M	Dsub_K_C3_M	Dmel_K_C3_L	Dsub_K_C3_L
	Dmel_K_C3_F	Dsub_K_C3_F		
	Dmel_Sl_C3_M	Dsub_Sl_C3_M	Dmel_Sl_C3_L	Dsub_Sl_C3_L
	Dmel_Sl_C3_F	Dsub_Sl_C3_F		

Za izolaciju DNK je korišćeno 25 ženki, 25 mužjaka i 40 uzoraka larvi po uzorku. Izolacija DNK je urađena prema modifikovanom protokolu Kapun i sar. (2020) kao i u prethodnom eksperimentu, uz modifikacije količina rastvora shodno broju jedinki. Ukupna koncentracija DNK u dobijenim uzorcima je utvrđena na uređajima *NanoPhotometer® N60* (IMPLEN, CA, SAD) i *Qubit* fluorometru (*Thermo Fisher Scientific, SAD*).

Zbog uočenih nečistoća u pojedinim uzorcima larvi, kod ovih uzoraka je urađen dodatni korak prečišćavanja i to na način da je uzeo 40 µL uzorka i dodata su 4 µL natrijum acetata, pH vrijednosti 5,2. Uzorci su vorteksovani i dodata su 2,5 volumena ledenog 96% etanola (100 µL). Nakon vorteksovanja, uzorci su stavljeni na inkubaciju na -80 °C u trajanju od 60 minuta. Po završetku inkubacije, uzorci su centrifugirani 20 minuta pri maksimalnoj brzini (9.500 rpm) na temperaturi od 4 °C. U sljedećem koraku je odliven etanol i dodato je 500 µL 70% etanola. Uzorci su još jednom centrifugirani i to 5 min na 10.000 rpm (bez hlađenja), nakon čega je odliven supernatant. Uzorci su sušeni 30 minuta na sobnoj temperaturi i rastvoreni u 50 µL TE pufera. Sekvenciranje je izvršeno od strane *Eurofins* firme (Njemačka).

Za preciznu identifikaciju V3-V4 varijabilnog regiona 16S rRNK gena, korišćena su dva tipa prajmera koji su međusobno dovoljno slični da omogućavaju poređenje. *Macrogen* i *Fisabio* su kao *forward* prajmer koristili 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', a kao *reverse* prajmer 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3' (Klindworth i sar., 2012). *Eurofins* je imao nešto drugačije prajmere, pri čemu je *forward* prajmer bio 5'-TACGGGAGGCAGCAG-3', dok je *reverse* prajmer imao sekvencu 5'-CCAGGTATCTAATCC-3' (Turner i sar., 1999; Kisand i sar., 2002).

Uslovi korišćeni pri PCR analizi su bili isti za sve uzorke. Ukratko, uzorci su prvo umnoženi u PCR reakciji, koristeći *Kapa 2G HiFi Hot-start ready miks 2x* (*Kapa Biosystems, Massachusetts, SAD*), sa sljedećim temperaturnim ciklusima: 5 minuta na 95 °C, 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi na 53 °C, 45 sekundi na 72 °C i konačni korak elongacije na 72 °C u trajanju od 10 minuta, nakon čega su uzorci prečišćeni pomoću *1X AMPure XP* perlica (*Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornija, SAD*). Amplikonske biblioteke su pripremljene korišćenjem *Nextera XT Index* kita prema protokolu za pripremu 16S biblioteka metagenomskim sekvenciranjem (dio #15044223 Rev. B) koristeći i5 i i7 prajmere, kao i adaptore potrebne za generisanje klastera, praćene konačnim korakom prečišćavanja pomoću *AMPure XP* perlica. Amplikonske biblioteke su provjerene pomoću *Agilent High Sensitivity* čipa na uređaju *Bioanalyzer 2100* i kvantifikovane pomoću *NanoPhotometer® N60* (*IMPLEN, CA, SAD*). Priprema *Illumina* 16S V3-V4 amplikonskih biblioteka i *MiSeq* 300 bp sekvenciranje uparenih krajeva (engl. *paired-end*) izvršeno je korišćenjem *MiSeq* reagenasa (*Illumina*). Uzorci su prošli provjeru kvaliteta i FASTQ podaci su dostavljeni na dalju obradu. Sve sekvence su pohranjene u NCBI bazi podataka kao bio-projekat pod pristupnim brojem PRJNA616141 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA616141>).

NGS sekvenciranjem su dobijeni demultipleksirani sortirani ridovi (engl. *reads*) sa uklonjenim adapterima i linkerima. Bioinformatička analiza je izvršena prateći DADA2 protokol (Rosen i sar., 2012; Callahan i sar., 2016a). Izvršeno je filtriranje, skraćivanje, procjena stope greške, inferencija uzoraka, spajanje uparenih krajeva i redukcija himernih sekvenci (Callahan i sar., 2016b). Prije kontrole kvaliteta i filtriranja, sekvence prajmera su uklonjene korišćenjem softvera *BBDuk* (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) i *cutadapt 3.4* (<https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>). Svi ridovi bez detektovanih prajmera su odbačeni. Nakon uklanjanja prajmera, *forward* ridovi su isječeni na 255 baza, a *reverse* ridovi na 195 baza (eksperiment Priroda/lab); 250 baza za *forward* ridove i 200 baza za *reverse* ridove (eksperiment Standard/olovo F13); 270 baza za *forward* ridove i 200 baza za *reverse* ridove (eksperiment Standard/olovo F35), na osnovu distribucije FASTQ ocjene kvaliteta. Nakon skraćivanja, ridovi sa očekivanim greškama ($\sum(10^{-Q/10})$, gdje je Q ocjena kvaliteta) većim od 2 (eksperiment Priroda/lab i Standard/olovo F35) i 6 (eksperiment Standard/olovo F13) za *forward* ridove i većim od 2 (eksperiment Standard/olovo F35) i 4 (eksperiment Priroda/lab i Standard/olovo F13) za *reverse* ridove, su odbačeni. Pored toga, ridovi sa dvosmislenim bazama (N) i ridovi kraći od 150 baza su odbačeni. Nakon procjene greške i inferencije sekvenci, parovi sekvenci su upareni korišćenjem minimalnog preklapanja od 17 baza (eksperiment Priroda/lab) i 20 baza (eksperiment Standard/olovo F13 i Standard/olovo F35) bez nepodudaranja. Sve sekvence između 400 i 428 baza su zadržane. Konačno, himerne sekvence su uklonjene korišćenjem podrazumijevanih podešavanja u okviru DADA2 protokola, kao što je opcija *removeBimeraDenovo* (<https://rdr.io/bioc/dada2/man/removeBimeraDenovo.html>), što je rezultiralo time da je 61-69% inicijalno sekvenciranih ridova zadržano u eksperimentu Priroda/lab, u eksperimentu Standard/olovo F13 je zadržano 89-93% za roditelje i 65-83% za potomstvo F13, dok je u eksperimentu Standard/olovo F35 zadržano 82-91% ridova.

3.9. Sastav mikrobiote i taksonomska analiza

Za utvrđivanje sastava prisutnih bakterijskih taksona, identifikovana je reprezentativna sekvenca svake varijante sekvenci amplikona (engl. *amplicon sequence variant*, ASV) na različitom klasifikacijskom nivou. ASV su agregirani na nivou filuma, porodice i roda, a svi oni koji su imali normalizovanu zastupljenost manju od 1% ili 2% (u zavisnosti od broja identifikovanih klasa) su označeni kao „Rod/pododica/filum predstavljen sa <1% ili 2%“. Prije dalje analize, uklonjene su sve sekvence sa neodređenim filumom ili one koje su kategorisane kao eukariotske na nivou carstva, hloroplastne na nivou reda i mitohondrijske na nivou porodice. Iako su svi ovi ASV činili samo mali dio ukupnog broja ridova, njihov udio u ukupnom broju ASV nije bio zanemarljiv. SILVA 16S v132 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-132/>) setovi su korišćeni kao referentne taksonomske baze podataka. Pored toga, identifikacija vrsta je izvršena tačnim podudaranjem ASV sa referentnim FASTA sekvencama (<https://zenodo.org/record/1172783>), kako bi se ulazne sekvence klasifikovale do rodova i vrsta. Normalizovana zastupljenost svakog ASV je izračunata u svakom uzorku dijeljenjem broja očitanih ASV sa ukupnim brojem za svaki uzorak.

U eksperimentu Standard/olovo F35, određivanje taksonomije do nivoa roda je izvršeno IDTAKSA algoritmom (Murali i sar., 2018), korišćenjem podrazumijevanih parametara i baze podataka SILVA v138 (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/>). Klasifikacija do nivoa vrste je izvršena sa SILVA setom za determinaciju vrsta (<https://zenodo.org/record/3731176>), korišćenjem tačnog podudaranja sekvenci pri čemu je dozvoljeno više podudaranja. Jedan ASV koji je imao mali broj ridova nije klasifikovan na nivou carstva pa je uklonjen je iz dalje obrade. Ukupno 4.749.959 ridova u 44 uzorka su dobijena nakon filtriranja i oni su korišćeni za dalju analizu.

3.10. Alfa diverzitet

Bakterijska raznovrsnost unutar zajednica (alfa diverzitet) određena je analizom zasnovanom na uzorkovanju na nivou ASV i korišćenjem *PhiloSeq 1.36.0* R paketa (McMurdie i Holmes, 2013) nakon rarefakcije do jednake dubine (uzorak sa najmanjim brojem ridova), i prikazana je kroz *Shannon*, *Gini-Simpson* i *invSimpson* alfa indekse. Uočeno i procijenjeno bogatstvo (engl. *richness*) je određeno prema broju uočenih sekvenci (engl. *observed*, OBS) i *Chao1* indeksu.

U eksperimentima Priroda/lab i Standard/olovo F13, korišćen je *Man Whitney Wilcoxon* (MWW) test za ispitivanje razlika u alfa diverzitetu na nivou ASV i nisu pronađene statistički značajne razlike, osim u jednom slučaju gdje je $p < 0,05$ za *Shannon* indeks diverziteta u F13 potomstvu između vrsta. U eksperimentu Standard/olovo F35, poređenje alfa diverziteta između uzoraka *D. melanogaster* i *D. subobscura*, kao i analiza uticaja supstrata na *Chao1* i *Shannon* indekse u okviru svake vrste je utvrđen korišćenjem *Wilcoxon Rank Sum* testa.

3.11. Beta diverzitet

Za procjenu beta diverziteta između uzoraka, korišćena je agregacija na nivou roda. Pošto su mnogi rodovi sa malom zastupljenošću bili prisutni u samo jednom ili nekoliko uzoraka, izvršeno je filtriranje prevalencije, gdje su uklonjeni svi rodovi prisutni u manje od četiri uzorka. Beta diverzitet ili diverzitet među zajednicama uzoraka je određen korišćenjem multidimenzionalnog skaliranja (engl. *multidimensional scaling*, MDS) izvršenog na ponderisanoj *UniFrac* matrici udaljenosti, izračunatoj korišćenjem $\log(x+1)$ -transformisanih abundancija rarefikovanih na jednaku dubinu (Lozupone i Knight, 2005). U eksperimentu Standard/olovo F35, pored MDS analize, beta diverzitet je procijenjen i korišćenjem analize dvostrukih glavnih koordinata filtriranih podataka o prevalenciji nakon rarefakcije do jednake dubine (engl. *double principal coordinate analysis*, DPCoA), čiji su rezultati prikazani (Pavoine i sar., 2004).

UniFrac matrica se obično koristi zajedno sa tehnikama ordinacije ili grupisanja za proučavanje filogenetskih odnosa između mikrobioloških zajednica. Iako je ovaj pristup standardni metod u mikrobiološkoj ekologiji, Eckburg i sar. (2005) koriste DPCoA analizu kao alternativu za proučavanje raznolikosti ljudske crijevne mikrobiote koristeći sekvence gena za 16S rRNK. DPCoA autput se oslanja na istovremeno predstavljanje tačaka vrsta i zajednica u redukovanom prostoru (faktorska mapa), gdje udaljenosti među vrstama čuvaju originalne razlike i koriste se za izračunavanje položaja tačaka zajednica. Glavne razlike između ova dva pristupa (*UniFrac* i DPCoA) su definicije filogenetskih udaljenosti među zajednicama i mogućnost DPCoA da predstavi organizme koji pokreću filogenetske razlike među zajednicama, pošto se i zajednice i vrste mogu ucrtati u isti prostor. Filogenetske distance između sekvenci su procijenjene poravnavanjem ASV sekvenci korišćenjem *DECIPHER* paketa (Wright, 2015) i tretiranjem sekvenci kao RNK, kako bi sekundarne strukture bile uzete u obzir tokom poravnanja. Filogenetsko stablo je konstruisano korišćenjem modela maksimalne vjerovatnoće (GTR+G(4)+I) sa paketom *Phangorn* (Schliep, 2011) i srednje je ukorišteno.

Da bi se procijenilo da li se mikrobiota razlikuje među vrstama i među fiksiranim efektima (pol i supstrat) unutar vrsta, permutaciona multivarijantna analiza varijanse (engl. *permutational multivariate analysis of variance*, PERMANOVA) je izračunata na DPCoA matricama udaljenosti, korišćenjem R paketa *vegan 2.5-7* (Oksanen i sar., 2020). Da bi se izvršila diferencijalna procjena brojnosti, korišćen je *Wilcoxon Rank Sum* test za testiranje razlika između relativne zastupljenosti svakog roda u svakoj vrsti *Drosophila*. Prilagođavanje p-vrijednosti za višestruka poređenja je izvršeno prema *Benjamini-Hochberg* metodi (Benjamini i Hochberg, 1995). Pored ovoga, urađeni su slični testovi kako bi se ispitalo da li pol, supstrat ili populacija utiču na abundanciju taksona unutar svake vrste; međutim, ni u jednom slučaju nije pronađena značajna razlika među taksonima korišćenjem neparametarskih testova. *Metacoder 0.3.5* paket (Foster i sar., 2017b) je korišćen za kreiranje glavnog diferencijalnog stabla koje vizuelizuje taksonomske kategorije koje se značajno razlikuju među grupama uzoraka. Sve analize su izvršene korišćenjem softvera R (verzija 4.1) i R Studio (verzija 1.4.1717) (RCoreTeam, 2021).

3.12. Ispitivanje osobina životne istorije

Vrste roda *Drosophila* imaju relativno kratak životni ciklus. Nakon parenja, jedan par može da proizvede stotine potomaka u približno 20 dana, na temperaturi od 19 °C. Pored toga, još jedna prednost *Drosophila* jeste što imaju tačno definisane razvojne stadijume: jaje, larva, lutka i adult. Ispitivane su dvije osobine životne istorije i to: preživljavanje od jaja do adulta i dužina razvića.

Preživljavanje od jaja do adulta predstavlja procentualni odnos izleglih adultnih jedinki u odnosu na broj postavljenih jaja. U eksperimentu Standard/olovo F35, preživljavanje je izračunato kao procenat jedinki koje su se razvile iz 30 inicijalno postavljenih jaja.

Dužina razvića predstavlja vrijeme trajanja ciklusa razvića, od trenutka kada je jedinka položila jaja pa sve do izlijevanja adulta, izraženo u danima. Dužina razvića je izračunata prema formuli:

$$DT = \frac{\sum n_d * d}{\sum n_d} \quad (1)$$

gdje je n_d broj mušica koje su se izlegle u d dana nakon što su jaja položena.

Larve trećeg stupnja su sakupljene iz dodatnih 5 flakona po grupi nakon inkubacije od pet do sedam dana, nakon čega su isprane u destilovanoj vodi i pohranjene u 96% etanol na -20 °C za dalju analizu.

3.12.1. Statistička analiza osobina životne istorije

Prije analize podataka dobijenih praćenjem osobina životne istorije, svi podaci su testirani na normalnost podataka pomoću *Shapiro-Wilk* testa. Budući da su i preživljavanje od jaja do adulta i dužina razvića pokazali normalnu raspodjelu, primijenjena je 3- i 4-faktorska analiza varijanse (ANOVA). Pri analizi osobine preživljavanja od jaja do adulta, korišćena je 3-faktorska ANOVA sa fiksnim faktorima pol, supstrat i vrsta, dok su za analizu dužine razvića uzete su u obzir i razlike između polova i korišćena je 4-faktorska ANOVA. *Bonferroni post hoc* test je korišćen kako bi se utvrdile precizne razlike između ispitivanih grupa. Svi testovi su urađeni u softveru *Statistica*, verzija 10 (StatSoftInc, 2011).

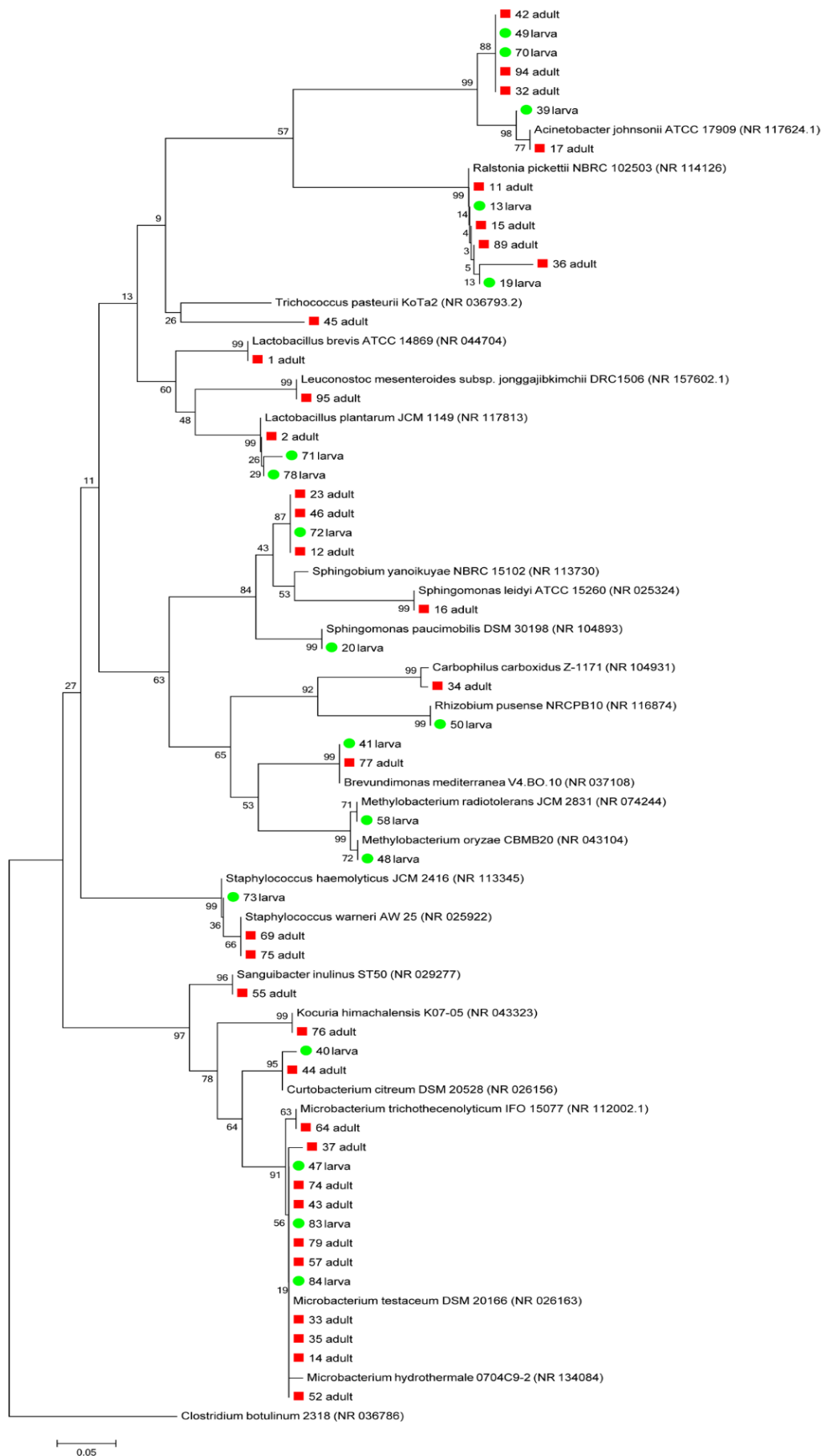
4. Rezultati

4.1. Taksonomska zastupljenost bakterijskih zajednica gajenih u kulturi

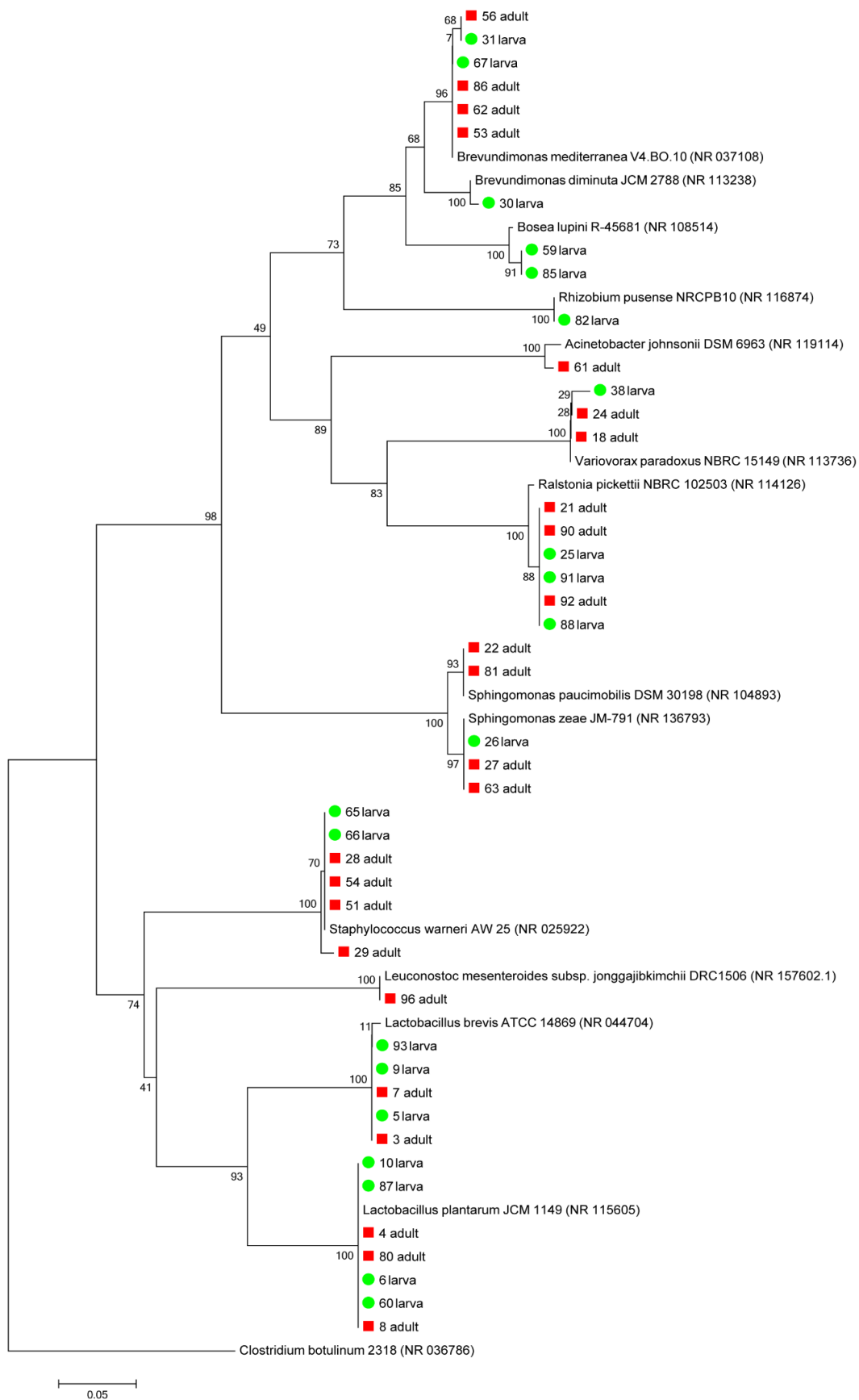
Da bi se utvrdio diverzitet bakterija, od kojih neke zahtijevaju specifične uslove rasta, uzorci adultnih jedinki i larvi trećeg stupnja *D. melanogaster* i *D. subobscura* su kultivisani na četiri različite mikrobiološke podloge za rast. Ukupno je dobijeno 95 izolata sa različitim morfologijama kolonija: 36 sa GYC agara, 25 sa LA, 21 sa MM agara i 13 sa MRS agara. Više izolata dobijeno je iz uzoraka odraslih jedinki obje vrste *Drosophila* nego iz larvi. Identifikacija bakterijskih izolata je postignuta poređenjem dobijenih sekvenci 16S rRNK sa onim deponovanim u NCBI bazi podataka, nakon čega je uslijedila filogenetska analiza.

U ukupnom broju izolata larvi i adulta, 16 rodova je identifikovano kod *D. melanogaster* i 10 kod *D. subobscura*, sa osam zajedničkih rodova (*Acinetobacter*, *Brevundimonas*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Sphingomonas* i *Staphylococcus*). Bakterijske vrste povezane sa *D. melanogaster* zastupljene sa velikim brojem izolata su bile *Acinetobacter johnsonii*, *Microbacterium testaceum* i *Ralstonia pickettii* (Slika 3). Najzastupljeniji bakterijski izolati kod jedinki *D. subobscura* su bili *Brevundimonas mediterranea*, *Lactobacillus plantarum*, *R. pickettii* i *Staphylococcus warneri* (Slika 4).

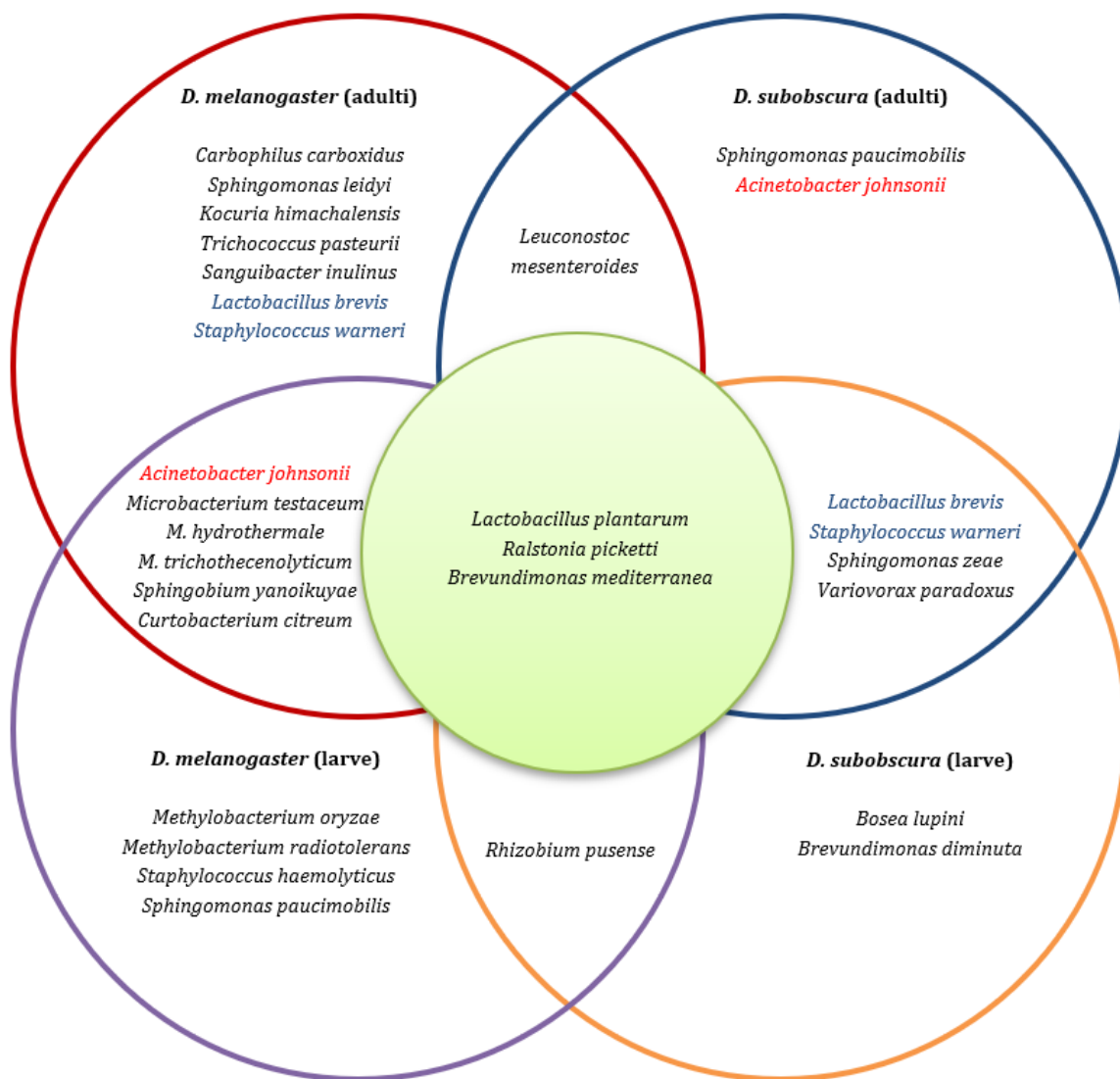
Distribucija bakterija izolovanih iz odraslih jedinki i larvi dvije vrste *Drosophila* uzgojene u laboratoriji, prikazana je na slici 5. Samo tri bakterijske vrste su bile povezane sa oba životna stadijuma kod obje vrste (*Lactobacillus plantarum*, *Ralstonia picketti* i *Brevundimonas mediterranea*). Međutim, primjećena je očigledna razlika u diverzitetu bakterija između razvojnih stadijuma kod obje vrste. Primjetno je da je rod *Methylobacterium* sa različitim vrstama bio prisutan samo kod larvi *D. melanogaster*, a *Rhizobium pusense* je bio zastupljen u larvama i *D. melanogaster* i *D. subobscura*. Vrste kao što su *Curtobacterium citreum*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Carbophilus carboxidus*, *Sphingomonas leidyi*, *Kocuria himachalensis*, *Trichococcus pasteurii*, *Sanguibacter inulinus* i tri vrste iz roda *Microbacterium* (*M. testaceum/hydrothermale/trichothecenolyticum*) su bile jedinstvene za *D. melanogaster*, a *Variovorax paradoxus* i *Sphingomonas zea* za *D. subobscura* larve i adulte. Sa druge strane, vrsta *Leuconostoc mesenteroides* je bila zajednička za adulte kod obje vrste i nije uočena u uzorcima larvi.



Slika 3. Neighbor-joining filogenetsko stablo zasnovano na sekvenci za 16S rRNK (1500 bp) koja pokazuje odnose između bakterijskih izolata odraslih jedinki *D. melanogaster* (crveni kvadrat), larvi (zeleni krug) i referentnih sojeva. *Clostridium botulinum* (NR_036786) je korišćen kao autgrupa. Bootstrap vrijednosti su prikazane na tačkama grananja.



Slika 4. *Neighbor-joining* filogenetsko stablo zasnovano na sekvenci za 16S rRNK (1500 bp) koja pokazuje odnose između bakterijskih izolata odraslih jedinki *D. subobscura* (crveni kvadrat), larvi (zeleni krug) i referentnih sojeva. *Clostridium botulinum* (NR_036786) je korišćen kao autgrupa. *Bootstrap* vrijednosti su prikazane na tačkama grananja.



Slika 5. Poređenje izolata bakterija između *D. melanogaster* i *D. subobscura* u dva razvojna stadijuma (adulti i larve). Oblasti koje se preklapaju predstavljaju zajedničke bakterijske vrste.

4.2. Taksonomska zastupljenost bakterijskih zajednica dobijenih metagenomskom analizom

Broj sekvenci dobijenih metagenomskom analizom prije i poslije filtriranja sekvenci je prikazan u Tabeli 4. Najveći procenat sekvenci je zadržan u posljednjem eksperimentu (Standard/olovo F35), između 85% i 91%, dok je najmanje sekvenci zadržano u prvom eksperimentu (61-68%).

Tabela 4. Broj sekvenci prije i poslije filtriranja u Priroda/lab, Standard/olovo F13 i Standard/olovo F35 eksperimentu.

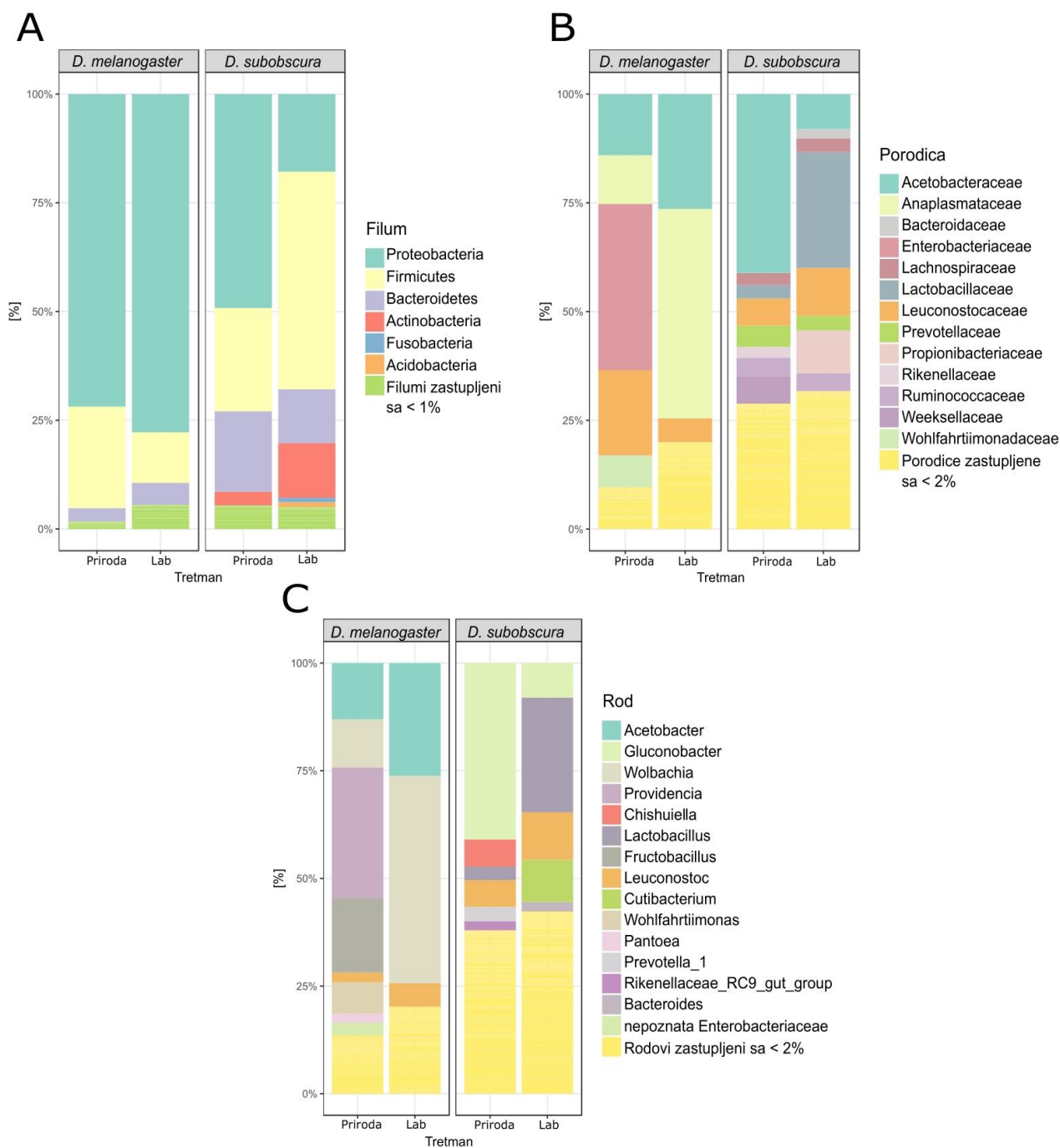
Uzorak	Ukupan broj sekvenci	Broj sekvenci korišćen za određivanje taksonomije	Procenat sekvenci korišćenih za dalju analizu
<i>Priroda/lab eksperiment</i>			
Dmel_Wild	265977	161238	60,62
Dmel_Lab	203990	139719	68,49
Dsub_Wild	191564	120445	62,87
Dsub_Lab	254907	163848	64,28
<i>Standard/olovo F13 eksperiment - roditeljska generacija</i>			
Dmel_St_F	87476	78551	89,8
Dmel_C3_F	127105	117139	92,16
Dmel_St_M	93932	85251	90,76
Dmel_C3_M	106375	98862	92,94
Dsub_St_F	100727	89379	88,73
Dsub_C3_F	107283	98965	92,25
Dsub_St_M	111499	98908	88,71
Dsub_C3_M	95378	87208	91,43
<i>Standard/olovo F13 eksperiment - F13 generacija</i>			
Dmel_St_F	117643	75616	64,28
Dmel_C3_F	156902	101291	64,56
Dmel_St_M	115733	80176	69,28
Dmel_C3_M	109119	78588	72,02
Dsub_St_F	110241	91131	82,67
Dsub_C3_F	138500	112503	81,23
Dsub_St_M	106719	81817	76,67
Dsub_C3_M	110374	82961	75,16
<i>Standard/olovo F35 eksperiment - F35 generacija (adulti)</i>			
Dmel_K_St_M	127453	115629	90,72
Dmel_K_St_F	588526	499203	84,82
Dmel_Sl_St_M	123931	112354	90,66
Dmel_Sl_St_F	102775	92051	89,57
Dmel_K_C3_M	133645	120614	90,25
Dmel_K_C3_F	130952	118720	90,66
Dmel_Sl_C3_M	133530	120983	90,60
Dmel_Sl_C3_F	48337	43380	89,74
Dsub_K_St_M	69370	61445	88,58
Dsub_K_St_F	50278	44509	88,53
Dsub_Sl_St_M	98992	80895	81,72
Dsub_Sl_St_F	144672	124540	86,08
Dsub_K_C3_M	126510	112384	88,83
Dsub_K_C3_F	143649	127757	88,94

Dsub_Sl_C3_M	121337	103970	85,69
Dsub_Sl_C3_F	88798	75184	84,67
Standard/olovo F35 eksperiment - F35 generacija (larve)			
Dmel_St_K_L	92464	83283	90,07
Dmel_St_Sl_L	148858	133862	89,93
Dsub_St_K_L	119238	106854	89,61
Dsub_St_Sl_L	91187	81730	89,63
Dmel_C3_K_L	137923	124053	89,94
Dmel_C3_Sl_L	49225	44747	90,90
Dsub_C3_K_L	90859	80750	88,87
Dsub_C3_Sl_L	109730	97466	88,82

Napomena: Sl – Slankamen; K – Kalna; St – standardni supstrat; C3 – supstrat sa dodatim olovom; F – ženke; M – mužjaci; L – larve.

U eksperimentu Priroda/lab, uočeno je 30 filuma u svim uzorcima, a najdominantniji su bili Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes i Actinobacteria (Prilog 1). Filum Proteobacteria je bio dominantan u uzorcima *D. melanogaster*, dok su Firmicutes, Bacteroidetes i Actinobacteria imali veću relativnu zastupljenost u uzorcima *D. subobscura*. Firmicutes, Actinobacteria, Acidobacteria i Fusobacteria su bili zastupljeniji u laboratorijski uzgojenim uzorcima *D. subobscura* nego u svim ostalim uzorcima, dok je najveća zastupljenost filuma Bacteroidetes uočena u uzorcima *D. subobscura* iz prirode (Slika 6A).

Na nivou porodice je pronađeno ukupno preko 200 bakterijskih taksona u svim ispitivanim uzorcima. Dominantne porodice kod *D. melanogaster* iz prirode su bile Enterobacteriaceae, Leuconostocaceae, Acetobacteraceae, Anaplasmataceae, Wohlfahrtiimonadaceae (detektovana samo u ovom uzorku i to sa preko 7% zastupljenosti) i Enterococcaceae. Kod laboratorijskih uzgojenih *D. melanogaster*, prisustvo porodice Anaplasmataceae je imalo najveću relativnu zastupljenost u odnosu na ostale uzorke (48%). Kod jedinki *D. subobscura* iz prirode, porodice Acetobacteraceae, Weeksellaceae, Leuconostocaceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae, Lactobacillaceae, Lachnospiraceae i Rikenellaceae su bile dominantne (Slika 6B). Zanimljivo, kod laboratorijski uzgojene *D. subobscura*, uočene su različite bakterijske porodice poput Lactobacillaceae, Leuconostocaceae, Propionibacteriaceae, Acetobacteraceae, Ruminococcaceae, Prevotellaceae, Lachnospiraceae, Bacteroidaceae, ali i Staphylococcaceae, Burkholderiaceae, Pseudomonadaceae, Flavobacteriaceae, Rhizobiaceae, Leptotrichiaceae, Caulobacteraceae, Paludibacteraceae i Succinivibrionaceae, iako u manjim procentima (0,5-2%), a koje su uglavnom bile manje zastupljene u uzorcima *D. melanogaster*, ili su bile potpuno odsutne. U okviru porodice Anaplasmataceae, rod *Wolbachia* je u najvećem procentu bio prisutan u oba uzorka *D. melanogaster*, dok je u uzorku *D. subobscura* iz prirode bio zastupljen minimalno (0,05%) i potpuno odsutan u laboratorijski uzgojenim uzorcima (Slika 6C).

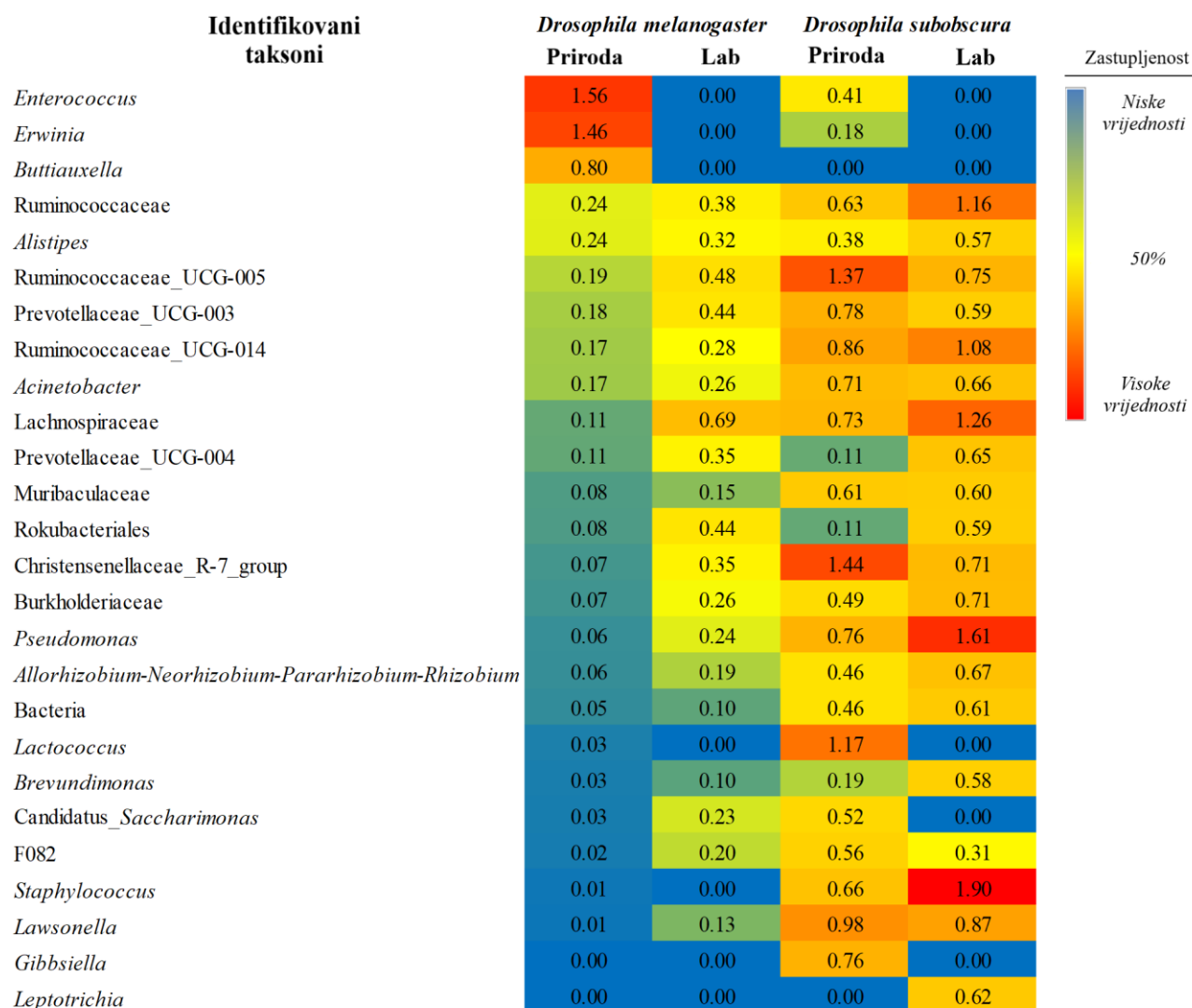


Slika 6. Relativna brojnost bakterijskih taksona u različitim uzorcima *Drosophila* (*D. melanogaster* i *D. subobscura*; priroda i laboratorija) na osnovu sekvenci gena 16S rRNK na nivou (A) filuma, (B) porodice i (C) roda u Priroda/lab eksperimentu (Beribaka i sar., 2021b).

Najzastupljeniji rodovi kod jedinki *D. melanogaster* iz prirode su bili *Providencia* (30%), *Fructobacillus* (17%, prisutan samo u ovom uzorku), *Acetobacter* (13%), *Wolbachia* (11%), *Wohlfahrtiimonas* (7%, prisutan samo u ovom uzorku), nepoznati rod iz porodice Enterobacteriaceae (3%), *Leuconostoc* (2%) i *Pantoea* (2%). Rod *Acetobacter* je bio veoma rasprostranjen u okviru oba uzorka *D. melanogaster*, kako iz laboratorije (26%) tako i iz prirode (13%), dok je bio skoro odsutan kod *D. subobscura* iz prirode (0,02%) i potpuno

odsutan kod *D. subobscura* nakon gajenja u laboratorijskim uslovima. Jedinke *D. melanogaster* iz laboratorije su imale samo tri roda sa zastupljenošću većom od 2%, i to *Wolbachia*, *Acetobacter* i *Leuconostoc*.

Nasuprot tome, *Gluconobacter* je bio dominantan rod kod *D. subobscura* iz prirode (41%), takođe prisutan, ali u znatno manjem procentu, kod laboratorijski gajenih jedinki *D. subobscura* (8%), dok je kod *D. melanogaster* bio prisutan u veoma malim količinama (1% kod *D. melanogaster* iz prirode i 0,2% iz laboratorije). Pored toga, *Chishuiella* (6%), *Leuconostoc* (6%), *Prevotella* (3%) i *Lactobacillus* (3%) su bili prisutni kod *D. subobscura* iz prirode, dok su potpuno drugačiji rodovi bili prisutni kod *D. subobscura* nakon gajenja u laboratoriji, kao što su *Lactobacillus* (26%), *Leuconostoc* (6%), *Cutibacterium* (10%) i *Bacteroides* (2%). Rod *Lactobacillus* je bio manje zastupljen u uzorcima iz prirode (*D. subobscura*, 3% i *D. melanogaster* 0,08%), u poređenju sa jedinkama iz laboratorije. Slično zapažanje je uočeno i za rodove *Leuconostoc* i *Bacteroides*.

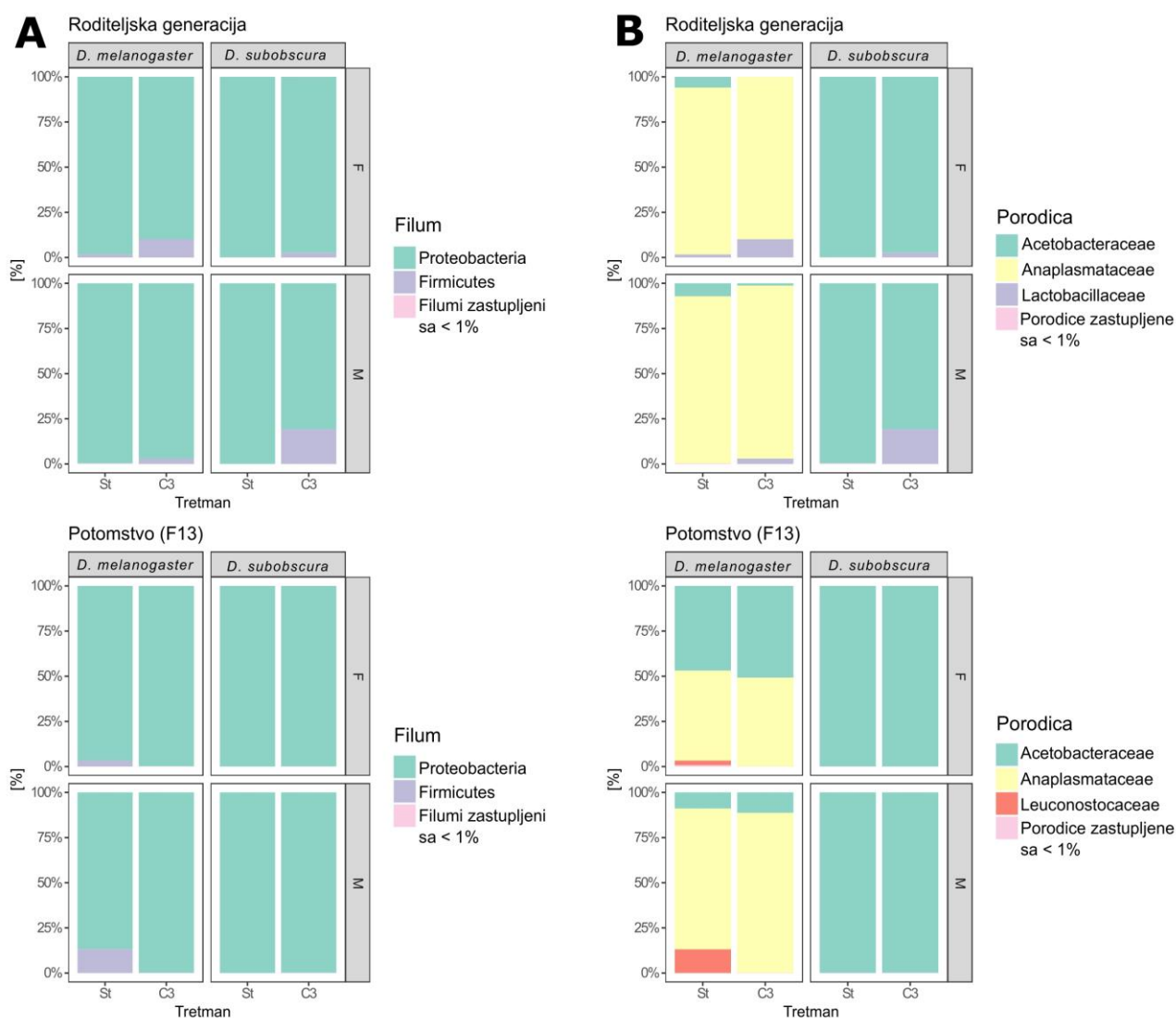


Slika 7. Relativna zastupljenost (između 0,5-2%) bakterijskih taksona procijenjena sekvencama gena za 16S rRNK na nivou roda.

Pored gore navedenih rodova, prisutni su bili i drugi bakterijski rodovi, ali u manjoj zastupljenosti (u rasponu od 0,5 do 2%) u uzorcima obje vrste (Slika 7).

Rodovi *Enterococcus* i *Erwinia* su dominirali u uzorcima iz prirode i potpuno su odsutni kod mušica koje se uzgajaju u laboratoriji, sa većom zastupljenošću kod *D. melanogaster*. U uzorcima iz prirode kod *D. subobscura*, preovladavali su rodovi *Lactococcus*, *Lawsonella*, *Gibbsiella* i *Acinetobacter*, kao i neki pripadnici porodica Ruminococcaceae i Christensenellaceae. Sa druge strane, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Leptotrichia*, *Alistipes* i *Brevundimonas* (svaki sa više od 0,5% relativne zastupljenosti) su dominirali u laboratorijski uzgajanim jedinkama *D. subobscura*.

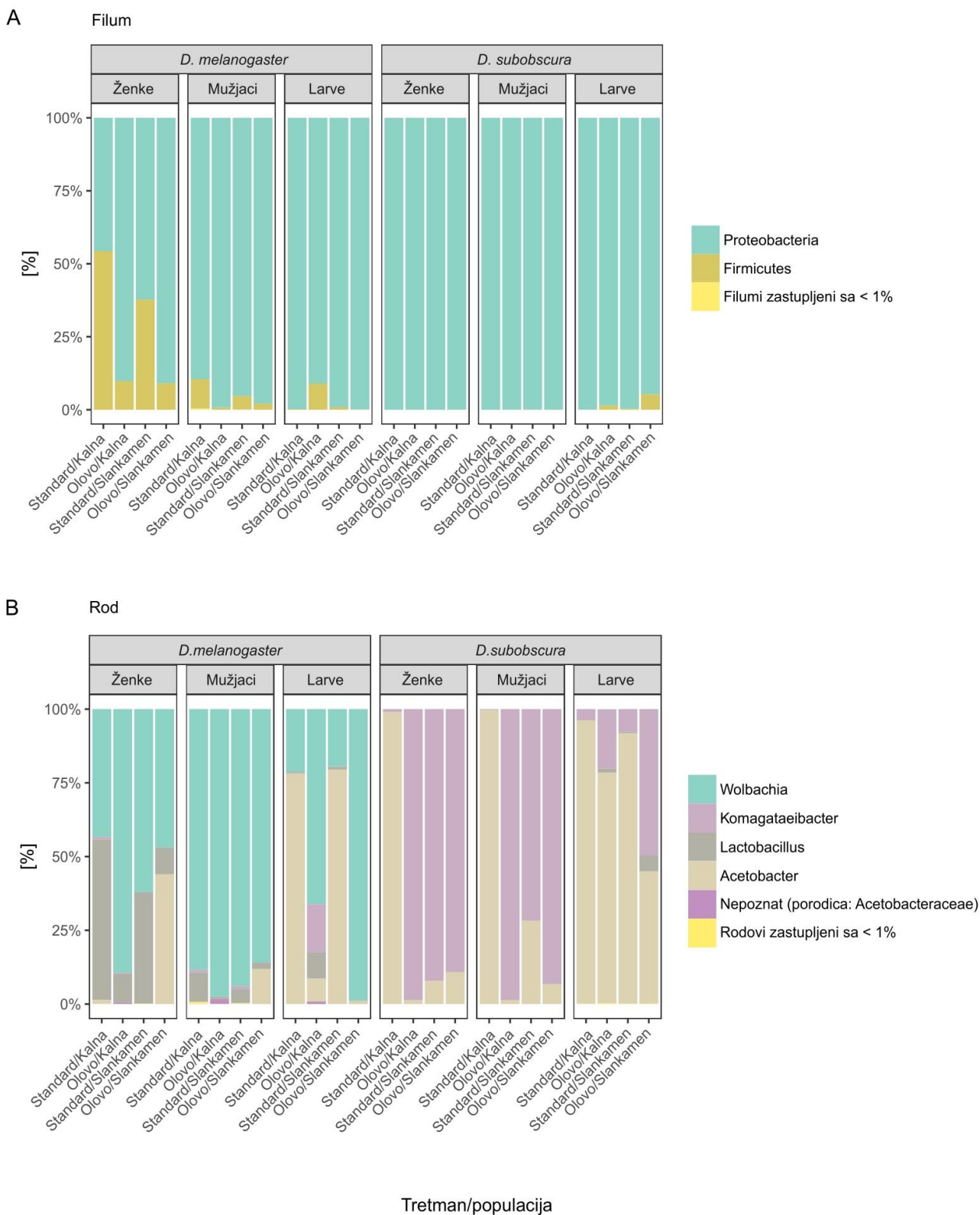
U eksperimentu Standard/olovo F13, u svim uzorcima je detektovano ukupno sedam filuma, a najviše su bili zastupljeni filumi Proteobacteria i Firmicutes, pri čemu je Proteobacteria bio prisutan sa 95% u roditeljskoj i 97% u potomačkoj F13 generaciji (Slika 8A) (Prilog 2).



porodica na kontrolnom supstratu je bila Acetobacteraceae, dok je na olovnom supstratu dominirala porodica Anaplasmataceae. Interesantno je da je zastupljenost porodice Lactobacillaceae na olovnom supstratu bila preko 8%, dok je na kontrolnom supstratu bila manja od 0,5% i favorizovana je kod mužjaka. U F13 potomstvu, kod *D. subobscura* je dominantno pronađena porodica Acetobacteraceae (>99%). Kod *D. melanogaster* u generaciji F13 je uočena veća bakterijska raznovrsnost na nivou porodice, gde su pronađene tri porodice sa više od 1% zastupljenosti (Anaplasmataceae 66%, Acetobacteraceae 29% i Leuconostocaceae 4%). Oba supstrata su imala sličnu brojnost Anaplasmataceae i Acetobacteraceae, ali su tokom generacija ženke akumulirale veće razlike u zastupljenosti ove dvije porodice nego mužjaci. Uzimajući u obzir vrstu, supstrat i pol, porodica Leuconostocaceae je bila favorizovana od strane *D. melanogaster*, standardnog supstrata i mužjaka.

Najzastupljeniji rodovi u roditeljskoj generaciji ukupno kod obje vrste su bili *Acetobacter*, *Wolbachia*, *Lactobacillus* i *Pediococcus* (>99,9%) (Slika 8C). Kod *D. subobscura*, rodovi *Acetobacter* (94%) i *Lactobacillus* (5%) su bili jedini rodovi koji su zastupljeni sa više od 1%. Sa druge strane, *D. melanogaster* je imala sva četiri dominantna roda (*Wolbachia* 92%, *Acetobacter* 4%, *Pediococcus* 2% i *Lactobacillus* 1%). *Acetobacter* je bio visoko zastupljen u uzorcima sa standardnog supstrata. *Pediococcus* je bio najzastupljeniji kod ženki *D. melanogaster* na olovnom supstratu (2%). Najzastupljeniji rodovi u potomstvu ukupno kod obje vrste su bili *Komagataeibacter* (51%), *Wolbachia* (33%), *Acetobacter* (13%) i *Leuconostoc* (2%). Sva četiri roda su bila zastupljena kod *D. melanogaster*, i to *Wolbachia* sa 66%, *Acetobacter* sa 16%, *Komagataeibacter* sa 13% i *Leuconostoc* sa 4%. U uzorcima *D. subobscura* su uočena samo dva roda sa preko 1% zastupljenosti, a to su *Komagataeibacter*, sa više od 89% zastupljenosti, i *Acetobacter* sa preko 9%. I supstrati i polovi su pokazali isti redoslijed zastupljenosti bakterijskih rodova: *Komagataeibacter* > *Wolbachia* > *Acetobacter* > *Leuconostoc*.

U eksperimentu Standard/olovo F35, u svim uzorcima je detektovano ukupno šest filuma. Najzastupljeniji filumi su bili Proteobacteria sa 87% i Firmicutes sa 13%, dok su ostala četiri filuma činila manje od 1% (Slika 9A) (Prilog 3). Filum Proteobacteria je bio dominantan u skoro svim uzorcima (u 23 od 24). S druge strane, filum Firmicutes je bio visoko zastupljen samo kod *D. melanogaster*, dok je njegova zastupljenost bila značajno manja u svim uzorcima *D. subobscura* (Prilog 4). Filum Firmicutes je sa 99,9% bio predstavljen rodom *Lactobacillus*. Drugi najzastupljeniji rodovi u svim uzorcima ukupno su bili *Wolbachia*, *Komagataeibacter* i *Acetobacter* (Slika 9B). *Wolbachia* (37% ukupno) je bila prisutna u svim uzorcima *D. melanogaster*, u rasponu od 2% do 22%, dok je u dva uzorka *D. subobscura* bila prisutna samo u tragovima (<0,01%). Drugi najzastupljeniji rod je bio *Komagataeibacter* (25% ukupno), od čega je 96% pronađeno u uzorcima *D. subobscura*. Povećana zastupljenost roda *Komagataeibacter* na supstratu sa dodatim olovom je uočena u 5 od 6 poređenja. Još jedan visoko zastupljen rod iz porodice Acetobacteraceae je bio rod *Acetobacter*, sa 65,5% kod *D. subobscura* i 33,5% kod *D. melanogaster*. U uzorcima larvi, unutar svake grupe je rod *Acetobacter* bio zastupljeniji u poređenju sa adultnim uzorcima. U pojedinačnim uzorcima larvi, rod *Acetobacter* je dominirao u svim uzorcima sa standardnog supstrata, dok je njegova zastupljenost na olovnom supstratu bila manja.



Slika 9. Relativna brojnost bakterijskih taksona u različitim uzorcima *Drosophila* (*D. melanogaster* i *D. subobscura*) na osnovu sekvenci gena 16S rRNK na nivou (A) filuma i (B) roda iz dvije populacije (Kalna i Slankamen) na kontrolnom i olovnom supstratu u uzorcima larvi i odraslih mužjaka i ženki u Standard/olovo F35 eksperimentu (Beribaka i sar., 2021a).

Sljedeći rod po ukupnoj brojnosti je bio *Lactobacillus* (13%) koji je pronađen u 98% uzoraka *D. melanogaster*, pri čemu je najveća zastupljenost uočena kod odraslih mušica. Svi ostali rodovi (kao što su *Vibrionimonas*, *Staphylococcus*, *Sphingomonas* i *Acinetobacter*) su bili zastupljeni sa manje od 1% ukupno. U uzorcima *D. subobscura*, rijetki rodovi kao što su *Staphylococcus*, *Sphingomonas*, *Vibrionimonas*, *Acinetobacter* i rod iz porodice Xanthobacteraceae bili su prisutni samo u uzorcima larvi. Zanimljivo je da su u uzorcima *D. melanogaster*, rodovi *Staphylococcus*, *Sphingomonas* i *Vibrionimonas* potpuno odsutni u uzorcima larvi, ali i u svim mušicama uzgajanim na supstratu sa dodatim olovom.

4.3. Alfa diverzitet

Indeksi alfa diverziteta za svaki uzorak Priroda/lab eksperimenta na nivou ASV su predstavljeni u Tabeli 5. Dobijeni rezultati ukazuju na to da su bakterijske zajednice *Drosophila* relativno bogate i homogene kada je u pitanju diverzitet mikrobiote u uzorcima iz prirode i uzgajanim u laboratoriji.

Tabela 5. Diverzitet i bogatstvo bakterijskih zajednica na nivou ASV kod *D. melanogaster* i *D. subobscura* predstavljeni kroz indekse alfa diverziteta u eksperimentu Priroda/lab (Beribaka i sar., 2021b).

Uzorak	Shannon	Gini-Simpson	invSimpson	OBS	Chao1	Chao1.se
Dmel_Wild	2,97	0,89	9,43	476	476,00	0,00
Dmel_Lab	2,45	0,71	3,39	414	414,00	0,08
Dsub_Wild	4,01	0,83	5,99	629	629,20	0,62
Dsub_Lab	4,35	0,95	18,28	489	489,17	0,54

Napomena: Wild – prirodna populacija; Lab – laboratorijski uzgojena populacija.

Alfa diverzitet je bio veći u oba uzorka *D. subobscura* u poređenju sa *D. melanogaster*, pri čemu su nešto veće vrijednosti dobijene kod jedinki koje su gajene u laboratoriji, nego kod onih koje su uzorkovane direktno iz prirode, prema *Shannon* i *Gini-Simpson* indeksima diverziteta. Nasuprot tome, uočeno bogatstvo (OBS) je imalo najveću vrijednost kod *D. subobscura* iz prirode. Međutim, svi indeksi alfa diverziteta su pokazali manji diverzitet i ujednačenost u oba uzorka *D. melanogaster* nego u uzorcima *D. subobscura*. Razlike između posmatranog i procijenjenog bogatstva su u pozitivnoj korelaciji sa *Chao1* indeksom. Najmanje bogatstvo je primjećeno u laboratorijskim uzorcima *D. melanogaster*, što je u pozitivnoj korelaciji sa indeksima diverziteta.

Analizom *Chao1* indeksa u eksperimentu Standard/olovo F13, utvrđeno je da kod obje vrste i oba supstrata (standardni i olovni) postoji veće bogatstvo ASV u potomstvu F13 u poređenju sa roditeljskom generacijom, odnosno da se bogatstvo ASV povećava sa brojem generacija provedenih u laboratoriji. *Shannon* i *Gini-Simpson* indeksi diverziteta su podržali ovakva zapažanja kod oba pola, pri čemu su veće vrijednosti primjećene uglavnom kod ženki (Tabela 6). *D. melanogaster* je imala veći diverzitet bakterija u poređenju sa *D. subobscura*, sa većim diverzitetom u F13 potomstvu u odnosu na roditeljsku generaciju, što pokazuje povećanje diverziteta tokom generacija, posebno na supstratu sa dodatim olovom, prema *Shannon* i *Gini-Simpson* indeksima diverziteta.

Tabela 6. Diverzitet i bogatstvo bakterijskih zajednica na nivou ASV kod *D. melanogaster* i *D. subobscura*, predstavljeni kroz indekse alfa diverziteta u eksperimentu Standard/olovo F13 (Beribaka i sar., 2021b).

Uzorak	Shannon	Gini-Simpson	InvSimpson	OBS	Chao1	Chao1.se
Roditeljska generacija						
Dmel_St_F	0,36	0,16	1,18	14	14,00	0,16
Dmel_C3_F	0,39	0,19	1,24	12	13,00	2,28
Dmel_St_M	0,33	0,15	1,18	16	16,00	0,00
Dmel_C3_M	0,28	0,10	1,11	17	17,00	0,24
Dsub_St_F	0,08	0,02	1,02	16	16,00	0,00
Dsub_C3_F	0,17	0,06	1,07	8	8,00	0,00
Dsub_St_M	0,08	0,02	1,02	16	17,00	2,29
Dsub_C3_M	0,56	0,32	1,48	9	9,00	0,00
Potomstvo F13						
Dmel_St_F	1,42	0,68	3,15	25	25,00	0,00
Dmel_C3_F	1,24	0,63	2,73	16	16,00	0,00
Dmel_St_M	0,98	0,43	1,76	19	19,00	0,00
Dmel_C3_M	0,62	0,27	1,38	18	18,00	0,00
Dsub_St_F	0,61	0,33	1,49	10	10,00	0,00
Dsub_C3_F	0,29	0,11	1,12	17	17,00	0,00
Dsub_St_M	0,64	0,34	1,52	14	14,00	0,00
Dsub_C3_M	0,35	0,13	1,15	22	22,00	0,00

Napomena: St – standardni supstrat; C3 – supstrat sa dodatim olovom; F – ženke; M – mužjaci.

Uočeno bogatstvo mikrobiote je pokazalo najveće vrijednosti u potomstvu F13 kod *D. melanogaster* na standardnom supstratu, a najmanje kod roditeljske generacije *D. subobscura* na olovnom supstratu. Međutim, svi indeksi su pokazali manji diverzitet i ujednačenost kod obje generacije *D. subobscura* nego kod *D. melanogaster*.

Prema *Shannon* i *Gini-Simpson* indeksima diverziteta u eksperimentu Standard/olovo F35, najveći diverzitet kod odraslih jedinki zabilježen je u uzorcima ženki *D. melanogaster* iz Kalne (standard) i iz Slankamena (standardni i olovni supstrat) (Tabela 7). Kada su u pitanju uzorci larvi, najveći diverzitet je zabilježen kod *D. melanogaster*, populacija Kalna na olovu, i oba uzorka *D. subobscura* na olovu (Kalna i Slankamen). Najmanji diverzitet kod odraslih jedinki utvrđen je kod oba pola i na oba supstrata kod *D. subobscura* iz populacije Kalne. Uzorci larvi sa najmanjim diverzitetom bili su *D. melanogaster* iz Slankamena na olovu i *D. subobscura* iz Kalne na standardu.

Slično *Shannon* i *Gini-Simpson* indeksima diverziteta, uočeno bogatstvo mikrobiote i *Chao1* indeks su imali najveće vrijednosti u uzorcima odraslih *D. melanogaster* na standardu u populaciji Kalna kod oba pola i populaciji Slankamen na standardu kod mužjaka. Najmanje bogatstvo mikrobiote kod odraslih jedinki je zabilježeno u 7 od 8 uzoraka *D. subobscura*. Uočeno bogatstvo kod larvi je bilo veće kod *D. subobscura* na olovu (kod obje populacije) nego kod svih uzoraka larvi *D. melanogaster*.

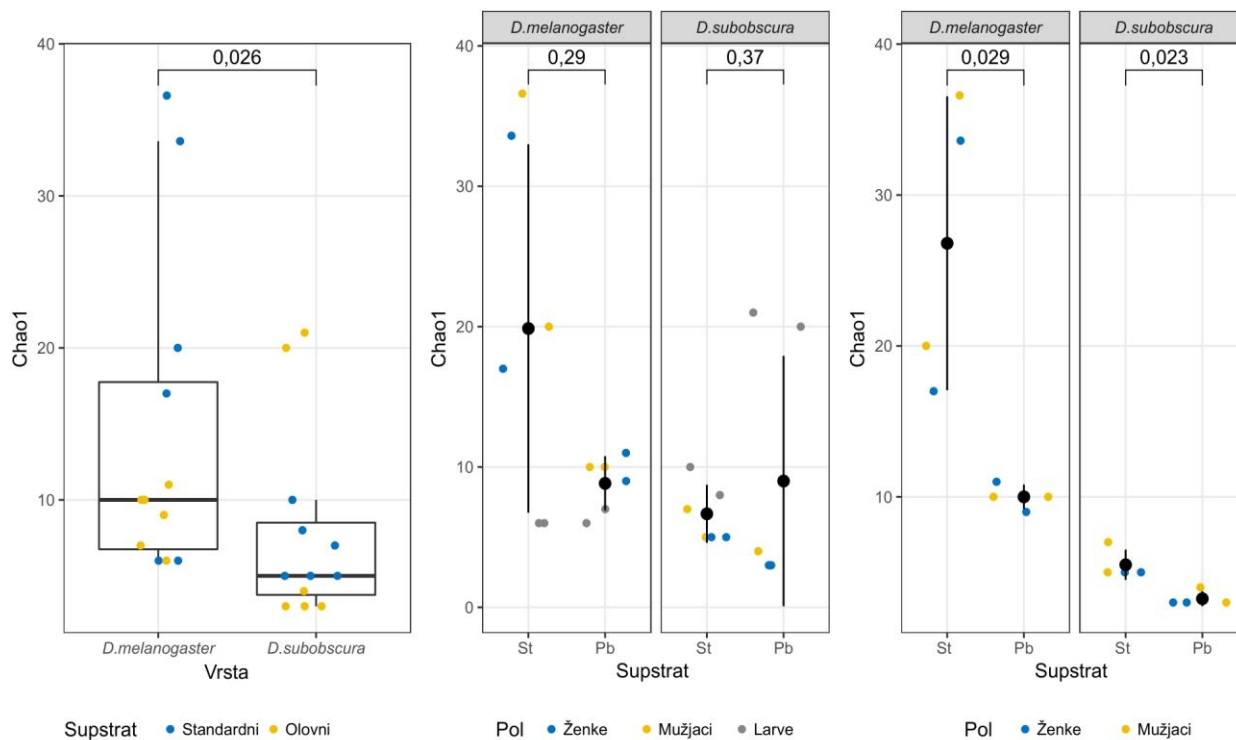
Tabela 7. Diverzitet i bogatstvo bakterijskih zajednica na nivou ASV kod *D. melanogaster* i *D. subobscura*, predstavljeni kroz indekse alfa diverziteta u eksperimentu Standard/olovo F35 (Beribaka i sar., 2021a).

Uzorak	Shannon	Gini-Simpson	InvSimpson	OBS	Chao1	Chao1.se
Dmel_K_St_M	0,57	0,21	1,27	36	36,6	1,18
Dmel_K_St_F	1,29	0,64	2,76	28	33,6	5,34
Dmel_Sl_St_M	0,34	0,12	1,13	20	20	0,00
Dmel_Sl_St_F	1,17	0,56	2,29	16	17	2,29
Dmel_K_C3_M	0,14	0,05	1,05	10	10	0,00
Dmel_K_C3_F	0,46	0,20	1,24	11	11	0,00
Dmel_Sl_C3_M	0,49	0,24	1,31	10	10	0,00
Dmel_Sl_C3_F	1,07	0,58	2,41	9	9	0,00
Dsub_K_St_M	0,05	0,02	1,02	5	5	0,00
Dsub_K_St_F	0,11	0,03	1,04	5	5	0,00
Dsub_Sl_St_M	0,60	0,41	1,69	7	7	0,46
Dsub_Sl_St_F	0,29	0,15	1,17	5	5	0,22
Dsub_K_C3_M	0,07	0,03	1,03	3	3	0,00
Dsub_K_C3_F	0,08	0,03	1,03	3	3	0,00
Dsub_Sl_C3_M	0,25	0,13	1,15	4	4	0,00
Dsub_Sl_C3_F	0,35	0,20	1,25	3	3	0,00
Dmel_St_K_L	0,56	0,35	1,53	6	6	0,00
Dmel_St_Sl_L	0,55	0,33	1,48	6	6	0,46
Dsub_St_K_L	0,18	0,08	1,09	8	8	0,00
Dsub_St_Sl_L	0,42	0,19	1,24	10	10	0,47
Dmel_C3_K_L	1,02	0,52	2,08	6	6	0,46
Dmel_C3_Sl_L	0,07	0,02	1,02	7	7	0,00
Dsub_C3_K_L	0,61	0,35	1,54	20	20	0,00
Dsub_C3_Sl_L	0,89	0,55	2,22	18	21	4,15

Napomena: Sl – Slankamen; K – Kalna; St – standardni supstrat; C3 – supstrat sa dodatim olovom; F – ženke; M – mužjaci; L – larve.

U pogledu alfa diverziteta u eksperimentu Standard/olovo F35, *Shannon* indeks nije pokazao statistički značajne razlike među grupama uzoraka, ali je *Chao1* indeks bio značajno manji u uzorcima *D. subobscura* (Slika 10).

Sa druge strane, kada su upoređeni uzorci sa standardnog i olovnog supstrata unutar svake vrste, nisu uočene statistički značajne razlike u *Chao1* indeksu, ni u jednom od uzoraka. Međutim, kada se isključe uzorci larvi, *Wilcoxon Rank Sum* test je pokazao statistički značajno niži indeks *Chao1* u uzorcima sa olovnog supstrata za obje vrste ($p < 0,05$).

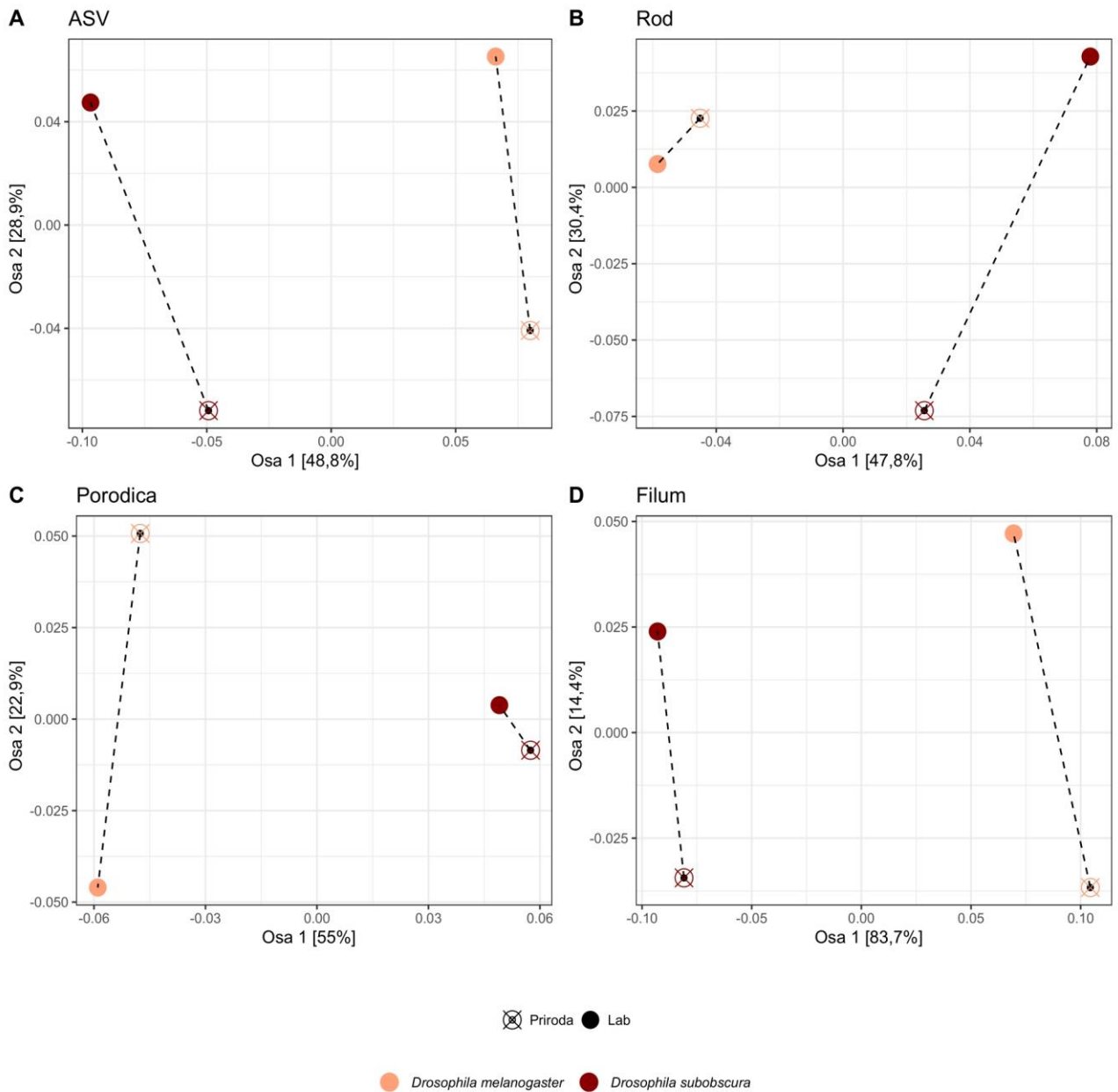


Slika 10. Razlike u *Chao1* indeksu između vrsta i tretmana *D. melanogaster* i *D. subobscura*, procijenjene *Wilcoxon Rank Sum* testom. Broj naveden u vrhu grafikona označava p-vrijednost za data poređenja (Beribaka i sar., 2021a).

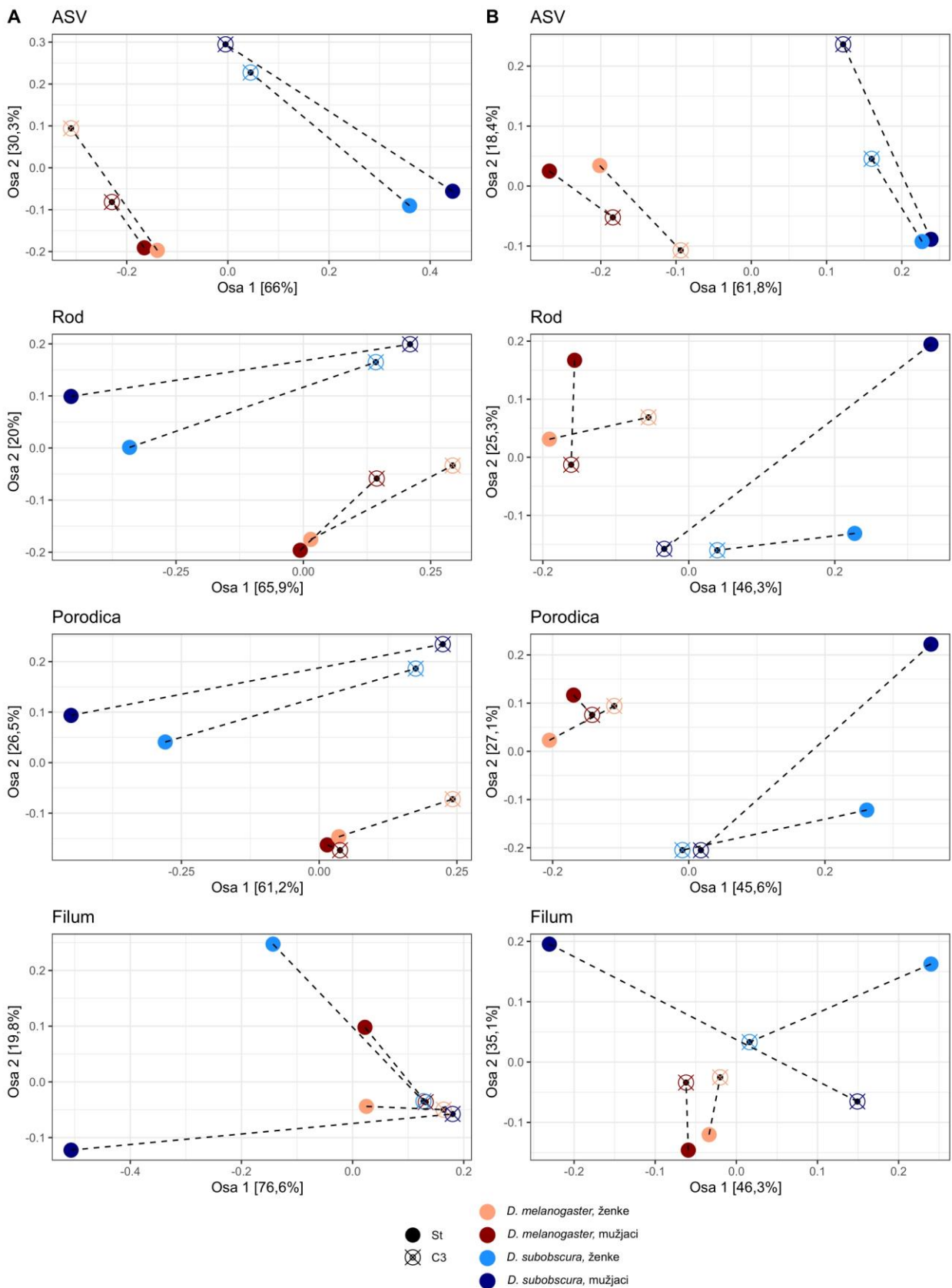
4.4. Beta diverzitet

U eksperimentu Priroda/lab, MDS analizom su sumirani odnosi beta diverziteta kada su u pitanju razlike u sastavu bakterijskih zajednica između *D. melanogaster* i *D. subobscura* koje su uzorkovane direktno iz prirode i uzgajane više generacija u laboratoriji, kako bi se predstavio originalni položaj bakterijskih zajednica u višedimenzionalnom prostoru (Slika 11). Mikrobiota kod dvije vrste *Drosophila* je razdvojena prvom MDS osom na svim ispitivanim taksonomskim nivoima, dok je razdvajanje između bakterijskih zajednica iz prirode i laboratorije, uočeno drugom MDS osom na nivou ASV i filuma.

U eksperimentu Standard/olovo F13, MDS analiza je pokazala globalne razlike u mikrobioti između vrsta (*D. melanogaster* i *D. subobscura*), generacija (roditeljska i potomačka F13), supstrata (standardni i olovni) i polova (Slika 12). MDS prikaz je otkrio trendove razdvajanja uzoraka prema supstratu (osa 1) i vrstama (osa 2) u roditeljskoj generaciji i nižu multivarijantnu disperziju uzoraka na supstratu sa dodatim olovom u poređenju sa kontrolnim supstratom (osa 1) u potomstvu F13. Razdvajanje polova je u izvjesnoj mjeri primjećeno na oba supstrata i kod obje vrste, posebno na nivou filuma.

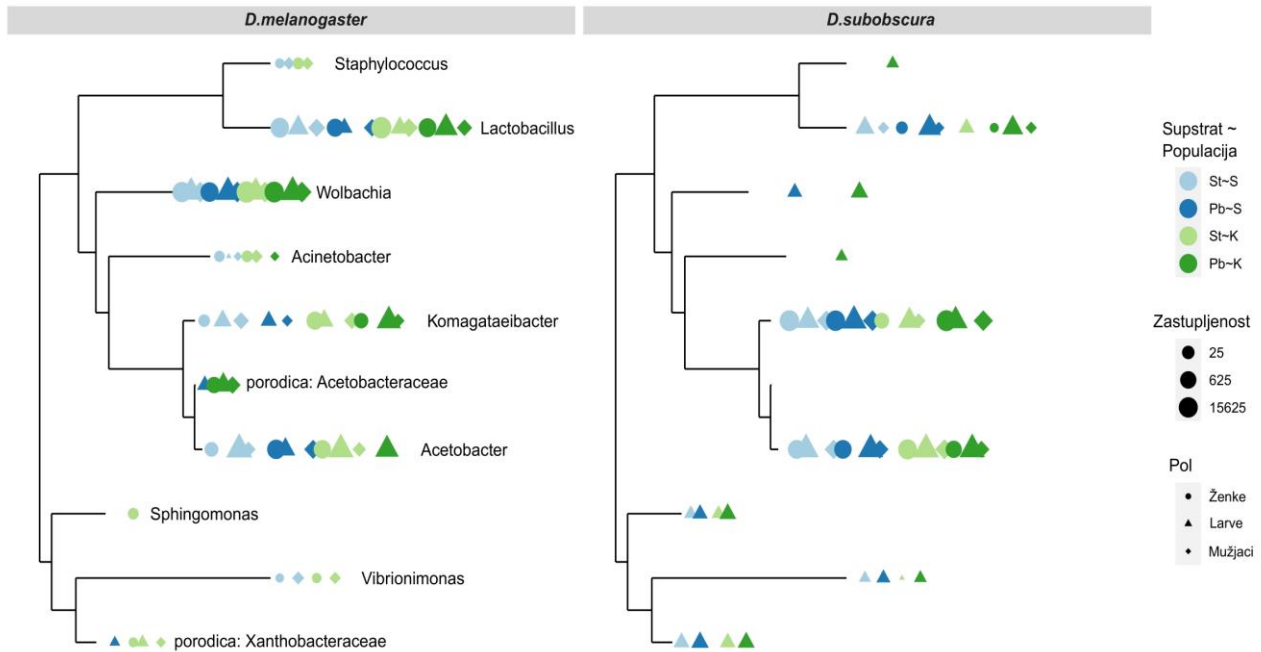


Slika 11. Multidimenzionalno skaliranje (MDS) sa ponderisanim *UniFrac* udaljenostima na prethodno $\log(x+1)$ -transformisanim abundancijama bakterijskog sastava u različitim uzorcima *Drosophila* (*D. melanogaster* i *D. subobscura*; priroda i laboratorija) na nivou (A) ASV, (B) roda, (C) porodice i (D) filuma u Priroda/lab eksperimentu (Beribaka i sar., 2021b).



Slika 12. Multidimenzionalno skaliranje (MDS) sa ponderisanim *UniFrac* udaljenostima na prethodno $\log(x+1)$ -transformisanim abundancijama bakterijskog sastava u različitim uzorcima *Drosophila* (*D. melanogaster* i *D. subobscura*) u roditeljskoj (A) i potomačkoj F13 generaciji (B) na nivou ASV, roda, porodice i filuma u Standard/olovo F13 eksperimentu. St – standardni supstrat; C3 – olovni supstrat (Beribaka i sar., 2021b).

U eksperimentu Standard/olovo F35, beta diverzitet je procijenjen korišćenjem analize dvostrukih glavnih koordinata (DPCoA) na filtriranim taksonima na osnovu zastupljenosti na nivou roda nakon rarefakcije do jednake dubine. Prije DPCoA analize, izračunate su filogenetske distance zasnovane na zastupljenosti ASV u uzorcima *D. melanogaster* i *D. subobscura* (Slika 13).

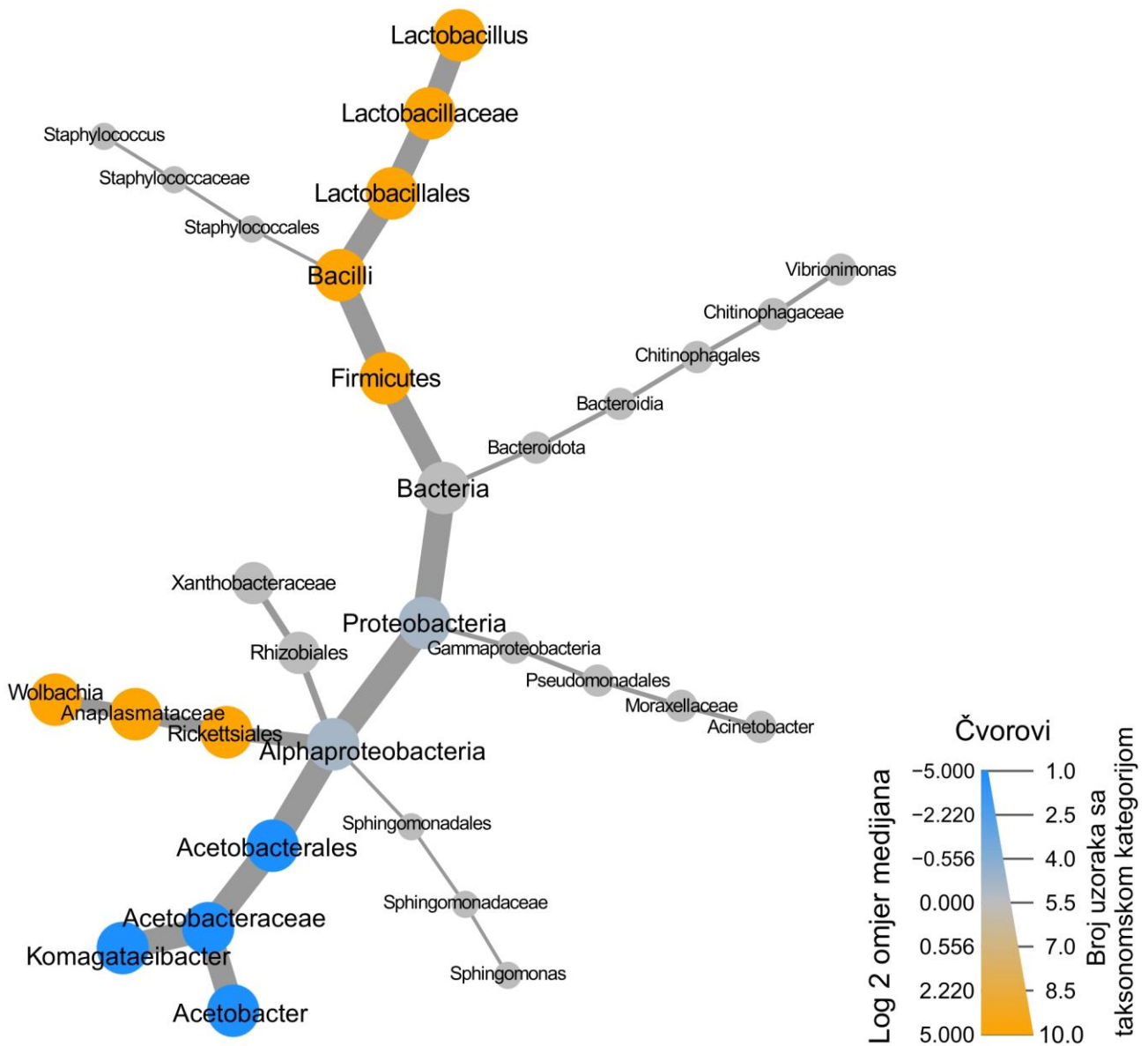


Slika 13. Filogenetsko stablo zasnovano na zastupljenosti ASV u uzorcima *D. melanogaster* i *D. subobscura*. Veličina simbola u blizini vrhova grana je zasnovana na zastupljenosti u odgovarajućim uzorcima. f - ženke; m - mužjaci; l - larve; S - Slankamen; K - Kalna; ctrl - kontrolni supstrat; Pb - olovni supstrat.

Uzorci koji pripadaju različitim vrstama *Drosophila* su razdvojeni prvom DPCoA osom (Slika 14). Svi uzorci *D. subobscura* su grupisani zajedno, dok su uzorci *D. melanogaster* dispergovani na biplotu. Djelimično razdvajanje uzoraka *D. subobscura* između kontrolnog i olovnog supstrata, primjećeno je po drugoj DPCoA osi. Pored toga, larve iz obje standardne populacije *D. melanogaster* su bile pozicionirane blizu uzoraka *D. subobscura*.

Da bi se istražio izvor variranja u bakterijskom sastavu, tačnije da bi se razlučili glavni efekti kao što su vrsta, supstrat, pol i njihove interakcije, izvedena je PERMANOVA na svim uzorcima i pojedinačno za *D. melanogaster* i *D. subobscura*, korišćenjem DPCoA udaljenosti između uzoraka. Kada se uzmu u obzir DPCoA rastojanja među svim uzorcima, najveći izvor variranja je bio posljedica uticaja vrsta i sve interakcije su bile značajne (Tabela 8).

Diferencijalna brojnost najzastupljenijih rodova ukazuje na to da je porodica Acetobacteraceae zastupljenija u uzorcima *D. subobscura*, i to sa dva roda *Komagataeibacter* i *Acetobacter*, dok je porodica Lactobacillaceae bila zastupljenija kod jedinki *D. melanogaster*, sa dominantnim rodom *Lactobacillus* (Slika 15). Pored navedenih, porodica Anaplasmataceae je takođe visoko zastupljena kod *D. melanogaster*, i to sa rodom *Wolbachia*. Pri analizi diferencijalne brojnosti najzastupljenijih rodova, supstrat i pol nisu imali značajan efekat kada su uzeti u obzir svi uzorci, niti kada su *D. subobscura* i *D. melanogaster* analizirane odvojeno.



Slika 15. Diferencijalno stablo brojnosti mikrobioloških zajednica kod vrsta *Drosophila* sa prilagođenim p-vrijednostima, $p < 0,05$. Narandžasto obojeni taksoni su zastupljeniji kod *D. melanogaster*, dok su plavo obojeni taksoni zastupljeniji kod *D. subobscura* (Beribaka i sar., 2021a).

4.5. Sadržaj olova i drugih makro- i mikroelemenata u uzorcima

Da bi se dobila relativna informacija o tome da li i koliko odrasle jedinke usvajaju olovo iz supstrata i ima li razlike među polovima, nakon 35 generacija provedenih na standardnom supstratu i supstratu sa dodatim olovom, izmjereno je sadržaj olova i drugih makro- i mikroelemenata u uzorcima *D. melanogaster* i *D. subobscura* iz Kalne ICP-OES metodom u eksperimentu Standard/olovo F35 (Tabela 9). Korišćene su samo mušice iz linija porijeklom iz Kalne jer je za analizu bilo potrebno sakupiti veliki broj jedinki, što je nakon višegeneracijskih eksperimenata bilo nedovoljno u grupama iz obje populacije, obje vrste.

Tabela 9. Sadržaj glavnih elemenata i elemenata u tragovima u ispitivanim uzorcima vrsta (*D. melanogaster* i *D. subobscura*), supstrata (standardni i olovni) i polova u eksperimentu Standard/olovo F35, izraženi u µg/g.

El.	Dmel_St_F	Dmel_St_M	Dmel_C3_F	Dmel_C3_M	Dsub_St_F	Dsub_St_M	Dsub_C3_F	Dsub_C3_M
Al	5,385	15,710	2,578	4,526	5,385	9,105	16,091	6,720
As	0,386	1,097	0,147	0,433	0,360	0,600	1,124	0,353
Ba	0,076	0,118	0,080	0,063	0,084	0,097	0,095	0,096
Ca	134,87	173,49	131,82	156,62	163,33	176,82	151,75	187,27
Cd	0,136	0,319	0,047	0,032	0,053	0,058	0,286	0,269
Co	0,000	0,012	0,002	<0,005	0,005	0,002	0,017	0,003
Cr	0,263	0,540	0,216	0,236	0,260	0,342	0,482	0,341
Cu	1,151	0,955	1,049	1,029	0,916	1,038	1,236	1,334
Fe	36,345	38,076	21,655	14,235	33,021	32,221	26,308	27,500
K	1980,39	2154,62	1937,15	2390,60	1589,24	1819,15	1753,90	2135,81
Li	0,067	0,088	0,053	0,076	0,065	0,083	0,070	0,096
Mg	209,24	217,31	214,39	256,88	189,79	208,82	180,88	223,03
Mn	2,049	2,141	1,726	1,754	1,050	1,074	1,242	1,168
Na	515,76	547,48	450,90	536,32	470,83	505,32	539,29	607,61
Ni	0,051	0,108	0,271	0,016	0,043	0,071	0,143	0,098
Pb	2,269	4,332	162,149	125,085	1,816	3,471	189,448	217,528
Sb	0,019	0,005	0,008	0,011	0,051	0,030	<0,005	0,102
Se	0,118	0,033	0,168	0,110	0,163	0,170	0,037	0,179
Sr	0,492	0,679	0,465	0,667	0,744	0,840	0,620	0,843
Zn	39,881	32,042	30,836	31,103	26,049	27,048	23,104	24,258

Rezultati su pokazali da su nakon 35 generacija uzorci *D. subobscura* na supstratu sa dodatim olovom akumulirali više olova nego uzorci *D. melanogaster* na istom supstratu. Takođe, količina akumuliranog olova je bila veća kod mužjaka nego kod ženki kod *D. subobscura*, dok su kod *D. melanogaster* dobijeni suprotni rezultati na supstratu sa olovom C3. Na standardnom supstratu su kod obje vrste mužjaci akumulirali više olova u odnosu na ženke.

4.6. Osobine životne istorije

Uticaj sastava mikrobiote, različitih supstrata i porijekla populacija praćen je na dvije osobine životne istorije i to, preživljavanje od jaja do adulta i dužinu razvića. Srednje vrijednosti izmjerenih osobina su otkrile da je vrijednost preživljavanja od jaja do adulta najveća kod *D. melanogaster* sa standardnog supstrata iz Kalne (0,88), a najniža kod *D. melanogaster* sa olovnog supstrata iz Slankamena (0,51), dok je dužina razvića bila najduža kod mužjaka *D. subobscura* sa olovnog supstrata iz Slankamena (23,06), a najkraća kod ženki *D. melanogaster* sa standardnog supstrata iz Kalne (19,24) (Tabela 10).

Tabela 10. Deskriptivna statistika za osobine preživljavanje od jaja do adulta i dužinu razvića za sve uzorke (dopunjeno iz Beribaka i sar. (2021a)).

	N	$\bar{X} \pm S.E.$	V	S.D.	CV (%)
Preživljavanje od jaja do adulta					
Dmel_K_St	30	0,8763±0,0068	0,001369	0,036998	4,22191
Dmel_Sl_St	30	0,7333±0,0180	0,009706	0,098518	13,43424
Dmel_K_C3	30	0,5890±0,0270	0,021892	0,147960	25,12049
Dmel_Sl_C3	30	0,5077±0,0298	0,026653	0,163257	32,15839
Dsub_K_St	30	0,7297±0,0166	0,008224	0,090686	12,42847
Dsub_Sl_St	30	0,8053±0,0165	0,008184	0,090467	11,23355
Dsub_K_C3	30	0,7790±0,0180	0,009747	0,098728	12,67370
Dsub_Sl_C3	30	0,7243±0,0164	0,008115	0,090084	12,43676
Dužina razvića					
Dmel_K_St_F	30	19,238±0,0578	0,100088	0,316367	1,644528
Dmel_K_St_M	30	19,567±0,0482	0,069658	0,263927	1,348849
Dmel_Sl_St_F	30	19,381±0,0588	0,103614	0,321891	1,660867
Dmel_Sl_St_M	30	19,782±0,0727	0,158401	0,397996	2,011915
Dmel_K_C3_F	30	20,744±0,1617	0,784699	0,885832	4,270321
Dmel_K_C3_M	30	21,513±0,1788	0,958626	0,979095	4,551090
Dmel_Sl_C3_F	30	20,537±0,1727	0,895043	0,946067	4,606638
Dmel_Sl_C3_M	30	21,075±0,1359	0,554048	0,744344	3,531834
Dsub_K_St_F	30	20,870±0,0503	0,076015	0,275708	1,321076
Dsub_K_St_M	30	20,580±0,0593	0,105370	0,324607	1,577325
Dsub_Sl_St_F	30	21,514±0,0795	0,189667	0,435508	2,024337
Dsub_Sl_St_M	30	21,420±0,0715	0,153241	0,391461	1,827528
Dsub_K_C3_F	30	22,547±0,0859	0,221420	0,470553	2,087017
Dsub_K_C3_M	30	22,687±0,0913	0,250196	0,500196	2,204814
Dsub_Sl_C3_F	30	22,955±0,0957	0,274504	0,523931	2,282440
Dsub_Sl_C3_M	30	23,058±0,1088	0,354941	0,595769	2,583835

Napomena: Sl – Slankamen; K – Kalna; St – standardni supstrat; C3 – supstrat sa dodatim olovom; F – ženke; M – mužjaci; N – broj uzoraka; \bar{X} – srednja vrijednost; S.E. – standardna greška; V – varijansa; S.D. – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije.

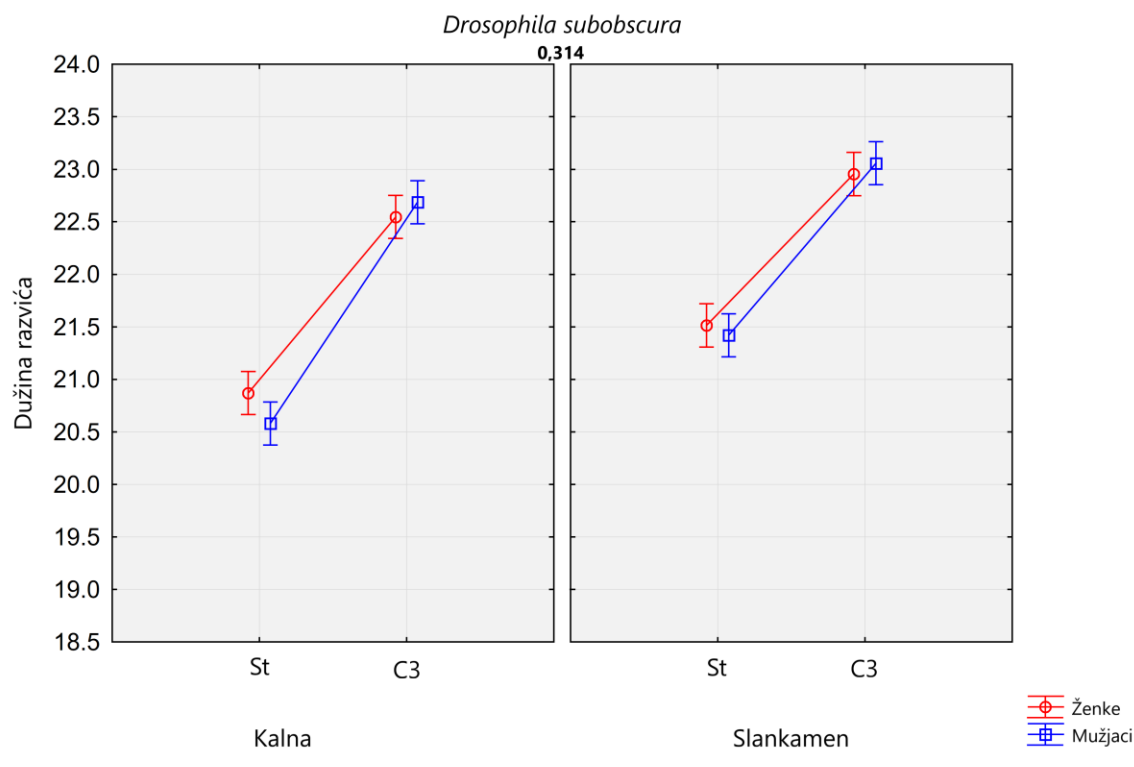
Analiza varijanse (ANOVA) je pokazala da populacija, supstrat, vrsta i pol značajno utiču na uočene razlike u obje ispitivane osobine životne historije, dok kada je riječ o interakcijama između ovih faktora, nisu sve interakcije bile značajne (Tabela 11).

Tabela 11. Rezultati faktorskog ANOVA testa na (a) preživljavanje od jaja do adulta i (b) dužinu razvića u odnosu na različite efekte (Beribaka i sar., 2021a).

Osobina	Efekat	df	SS	MS	F	p
(a) preživljavanje od jaja do adulta	Populacija	1	0,1550	0,1550	13,21	0,00
	Supstrat	1	1,1125	1,1125	94,79	0,00
	Vrsta	1	0,4133	0,4133	35,22	0,00
	Populacija × supstrat	1	0,0177	0,0177	1,51	0,22
	Populacija × vrsta	1	0,2257	0,2257	19,23	0,00
	Supstrat × vrsta	1	0,8688	0,8688	74,03	0,00
	Populacija × supstrat × vrsta	1	0,1382	0,1382	11,78	0,00
(b) dužina razvića	Populacija	1	7,3	7,3	22,3	0,00
	Supstrat	1	305,5	305,5	931,2	0,00
	Vrsta	1	356,7	356,7	1087,1	0,00
	Pol	1	6,7	6,7	20,6	0,00
	Populacija × supstrat	1	5,5	5,5	16,7	0,00
	Populacija × vrsta	1	12,2	12,2	37,2	0,00
	Supstrat × vrsta	1	1,7	1,7	5,3	0,02
	Populacija × pol	1	0,0	0,0	0,0	1,00
	Supstrat × pol	1	2,7	2,7	8,3	0,00
	Vrsta × pol	1	8,9	8,9	27,1	0,00
	Populacija × supstrat × vrsta	1	0,2	0,2	0,5	0,48
	Populacija × supstrat × pol	1	0,5	0,5	1,6	0,2
	Populacija × vrsta × pol	1	0,2	0,2	0,6	0,45
Supstrat × vrsta × pol	1	0,0	0,0	0,0	0,91	
Populacija × supstrat × vrsta × pol	1	0,0	0,0	0,0	0,87	

Napomena: df – stepen slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrijednost kvadrata; F – vrijednost F testa; p – nivo značajnosti, statistički značajne vrednosti su zatamnjene.

Post hoc analiza je otkrila da se preživljavanje od jaja do adulta nije značajno razlikovalo među populacijama *D. subobscura* na standardnom supstratu ($p=0,21$) i olovnom supstratu ($p=1,00$) (Prilog 7). Takođe, nije bilo značajnih razlika između supstrata u bilo kojoj od populacija kod *D. subobscura* ($p=1,00$ za populaciju Kalna, $p=0,12$ za populaciju Slankamen). S druge strane, kod *D. melanogaster* uočeno je značajno niže preživljavanje na supstratu sa dodatim olovom u odnosu na standardni supstrat u obje populacije ($p=0,00$ za populaciju Kalna, $p=0,00$ za populaciju Slankamen), ali nije primjećena značajna razlika između populacija na supstratu sa dodatim olovom ($p=0,11$) (Slika 16A). Sva ostala poređenja su pokazala statistički značajne razlike ($p<0,05$).



Slika 16. Grafički prikaz LS srednjih vrijednosti analiziranih osobina životne istorije, (A) preživljavanje od jaja do adulta, (B) dužina razvića kod *D. melanogaster*, i (C) dužina razvića kod *D. subobscura*, koji prikazuje promjene koje su nastale na standardnom i olovnom supstratu u različitim grupama i podgrupama *Drosophila*; St – standardni supstrat, C3 – olovni supstrat (Beribaka i sar., 2021a).

U analizu dužine razvića je uključen i pol kao još jedan potencijalni faktor koji može uticati na bakterijske zajednice. *Post hoc* analiza je otkrila da na standardnom supstratu nije bilo značajnih razlika između mužjaka i ženki za obje vrste u okviru iste populacije ($p=1,00$ za obje vrste iz populacije Kalna, $p=0,83$ za *D. melanogaster* iz populacije Slankamen, $p=1,00$ za *D. subobscura* iz populacije Slankamen) (Prilog 8). *D. subobscura* je pokazala ovakav obrazac i na supstratu sa dodatim olovom za obje populacije ($p=1,00$ za obje populacije), dok su kod *D. melanogaster* uočene značajne razlike među polovima na supstratu sa dodatim olovom za obje populacije, pri čemu je razviće bilo duže kod mužjaka nego kod ženki ($p=0,00$ za populaciju Kalna, $p=0,04$ za populaciju Slankamen). Kod *D. melanogaster*, mužjaci i ženke sa istog supstrata, a različitih populacija se nisu značajno razlikovali ($p=1,00$ i za mužjake i za ženke) (Slika 16B). Kod *D. subobscura*, ovaj obrazac je uočen samo za supstrat sa dodatim olovom ($p=0,72$ za ženke, $p=1,00$ za mužjake) (Slika 16C). Sva ostala poređenja su pokazala statistički značajne razlike ($p<0,05$).

5. Diskusija

Primarni fokus istraživanja datih u ovoj disertaciji je bio da se utvrdi diverzitet bakterijskih zajednica mikrobiote povezanih sa dvije vrste *Drosophila*, i to *D. melanogaster* i *D. subobscura*, uzorkovanih direktno iz prirode i promjene tokom generacija održavanih u jednakim uslovima u laboratoriji, ali na standardnom i supstratu sa dodatkom olova. Pored toga, ispitivane su i asocijacije između sastava bakterijskih zajednica mikrobiote i osobina životne istorije ovih vrsta u datim eksperimentalnim uslovima. Po prvi put su na ovaj način istražene bakterijske zajednice povezane sa vrstom *D. subobscura*, u poređenju sa dobro poznatim model organizmom *D. melanogaster*, pri čemu su obje vrste gajene u istim uslovima. Takođe, prvi put je ispitivan efekat mikrobiote kod ove dvije vrste na osobine životne istorije u uslovima zagađenja teškim metalom (olovom).

U prvom eksperimentu Priroda/lab, uzorci su analizirani metodom gajenja u kulturi i metagenomskom analizom. Rezultati metagenomske analize su otkrili da su *D. melanogaster* i *D. subobscura* pokazale različite pravce promjene u diverzitetu bakterijskih zajednica na nivou ASV (engl. *amplicon sequence variant*, ASV) između prirodnih i laboratorijski uzgajanih jedinki na standardnom supstratu. Naime, kod *D. subobscura* je uočeno povećanje bakterijskog diverziteta u laboratorijskim uslovima, dok je kod *D. melanogaster* bakterijski diverzitet smanjen u laboratoriji, u odnosu na prirodnu populaciju. Bakterijsko bogatstvo je bilo konzistentno u poređenju sa diverzitetom kod *D. melanogaster*, dok je kod *D. subobscura* bakterijsko bogatstvo smanjeno u laboratorijskim uslovima. Rezultati drugog eksperimenta Standard/olovo F13 su pokazali povećanje bakterijskog diverziteta kod obje vrste nakon 13 generacija u laboratoriji, sa nešto većim vrijednostima kod *D. melanogaster*. Pošto su uzorci *D. subobscura* iz naša dva eksperimenta (Priroda/lab i Standard/olovo F13) bili različitog porijekla, nepodudaranje rezultata bi mogla biti posljedica inicijalnog populacijski-specifičnog odgovora *D. subobscura* na laboratorijske uslove u vidu povećanja bakterijskog diverziteta u prvom eksperimentu, dok se on smanjio tokom generacija provedenih u laboratoriji. Ukupan bakterijski diverzitet uočeni u eksperimentu Standard/olovo F13 je smanjen u poređenju sa eksperimentom Priroda/lab. U eksperimentu Standard/olovo F35, ukupan bakterijski diverzitet i bogatstvo kod *D. subobscura* gajenih u laboratoriji je bio niži u odnosu na *D. melanogaster* u ukupnoj analizi, ali i kod obje vrste na supstratu sa dodatim olovom, kada su uključeni samo adulti oba pola. Dodavanjem populacije Slankamen u ovaj eksperiment, može se vidjeti da je populacija *D. melanogaster* iz Kalne uglavnom pokazivala veće vrijednosti u pogledu bakterijskog diverziteta i bogatstva u odnosu na populaciju Slankamen. Nasuprot tome, *D. subobscura* porijeklom iz Slankamena je pokazala veći bakterijski diverzitet od populacije Kalna. Sličan obrazac je primjećen i za adulte i za larve, što ukazuje na to da bi promjena bakterijskog diverziteta usljed izloženosti olovu mogla biti specifična kako za vrstu tako i za populaciju (Griffiths i sar., 2019; Houwenhuysen i sar., 2021; Maraci i sar., 2021).

Analizom sastava bakterijskih zajednica kod *D. melanogaster* u eksperimentu Priroda/lab, utvrđena je značajna dominacija porodica Acetobacteraceae i Anaplasmataceae, dok su ostale porodice poput Lactobacillaceae i Leuconostocaceae bile manje zastupljene. Porodicu Anaplasmataceae predstavljao je samo jedan rod, *Wolbachia*. Dugogodišnjim praćenjem prisustva roda *Wolbachia* prije svih laboratorijskih eksperimenata sa uzorcima *D. melanogaster* i *D. subobscura* iz različitih populacija, ovaj rod do sada nikada nije otkriven kod

D. subobscura (Jelić i sar., 2012; Erić i sar., 2019). Brojna istraživanja pokazuju da mikrobiota *D. melanogaster* predstavlja primjer bakterijske zajednice niskog diverziteta i velike varijabilnosti, pri čemu dominantni taksoni variraju među laboratorijama i često su pod uticajem ishrane (Broderick i Lemaitre, 2012). Pripadnici porodice Acetobacteraceae i Lactobacillaceae su često prisutni među rijetkim dominantnim taksonima mikrobiote *D. melanogaster* (Wong i sar., 2011; Erkosar i sar., 2013). Međutim, dominantni taksoni se razlikuju među studijama; na primjer, jedna studija o laboratorijski uzgajanoj *D. melanogaster* je pronašla bakterijske zajednice sa velikim udjelom roda *Enterobacter* (Gammaproteobacteria) ili *Enterococcus* (Firmicutes) zajedno sa Acetobacteraceae, ali sa slabo zastupljenim rodом *Lactobacillus* (Cox i Gilmore, 2007); još jedna studija je otkrila da crijeva *D. melanogaster* sadrže veliki broj Enterobacteriaceae i Acetobacteraceae, ali malo *Lactobacillus* i skoro nikako *Enterococcus* (Chandler i sar., 2011); dok je studija Staubach i sar. (2013) u istraživanju mikrobiote laboratorijskih linija *D. melanogaster* i *D. simulans*, kao najzastupljenije bakterijske rodove pronašla *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*. Neki od pomenutih rodova su pronađeni i u prirodnim populacijama *D. melanogaster* i *D. simulans* (Corby-Harris i sar., 2007). Staubach i sar. (2013) su uočili da je rod *Gluconobacter* najzastupljeniji rod kod *D. melanogaster* i *D. simulans* iz prirode, koje su kosmopolitske vrste i dijele slična staništa, ali sa različitom sezonskom dinamikom populacija (Capy i Gibert, 2004). Međutim, rezultati studije Chandler i sar. (2011), koja je ispitivala 14 različitih vrsta *Drosophila*, ukazuju na skoro potpuno odsustvo roda *Gluconobacter* (Acetobacteraceae) u ispitivanim uzorcima. Rezultati dobijeni u ovom radu su u saglasnosti sa studijom Chandler i sar. (2011) kada je u pitanju vrsta *D. melanogaster*, pošto je prisustvo roda *Gluconobacter* u populaciji *D. melanogaster* (eksperiment Priroda/lab) bilo zanemarljivo, dok je nasuprot tome, on bio najzastupljeniji rod kod *D. subobscura* iz prirode. Pored toga, kod jedinki uzgajanih u laboratoriji, rod *Gluconobacter* nije pronađen ni u roditeljskoj, a ni u F13 i F35 generacijama potomaka. Sa druge strane, rod *Acetobacter*, koji pripada istoj porodici Acetobacteraceae, je najzastupljeniji rod kod *D. melanogaster* iz prirode, ali i kod *D. subobscura* uzgojenih u laboratoriji (roditeljska generacija Standard/olovo F13 eksperimenta). Bakterije iz roda *Acetobacter* imaju sposobnost oksidacije sirćetne kiseline putem ciklusa trikarboksilne kiseline (TCA). Nasuprot tome, *Gluconobacter* nema funkcionalni TCA ciklus zbog nedostatka dva ključna enzima, alfa-ketoglutarat dehidrogenaze i sukcinat dehidrogenaze, i ne može da oksiduje sirćetnu kiselinu i druge organske kiseline, koje ponekad stvaraju pojedini članovi mikrobiote, kao što je rod *Leuconostoc* (Moreno i Peinado, 2012). Rod *Gluconobacter* se s druge strane odlikuje boljom sposobnošću korišćenja šećera od roda *Acetobacter* (Mamlouk i Gullo, 2013). Eksperiment Standard/olovo F13 je otkrio veću zastupljenost roda *Acetobacter* kod *D. subobscura* na oba supstrata u roditeljskoj generaciji. Istraživanja ukazuju na to da se reproduktivne i hranljive koristi (Pais i sar., 2018) kao i zaštita od patogena (Haghshenas i sar., 2015), mogu dobiti od roda *Acetobacter*. Zanimljivo je da se tokom nekoliko generacija u laboratoriji, brojnost roda *Acetobacter* smanjila u korist roda *Komagataeibacter* iz iste porodice. *Komagataeibacter* nije tipičan član bakterijskih zajednica povezanih sa vrstama roda *Drosophila*, ali je njegovo prisustvo uočeno u studijama starenja kod *D. melanogaster*, gdje su autori povezali sposobnost roda *Komagataeibacter* da smanji nivoe triglicerida i glukoze, sa produženim životnim vijekom domaćina (Chaston i sar., 2014; Lee i sar., 2019).

Dok je u navedenim studijama uočeno prisustvo roda *Komagataeibacter* kod *D. melanogaster*, ovom radu je on pronađen u većoj količini kod *D. subobscura*, pri čemu se njegova zastupljenost povećavala sa brojem generacija provedenim na olovnom supstratu. *D. melanogaster* je takođe akumulirala ovaj bakterijski rod, posebno ženke, ali u dosta manjem procentu. Dominacija roda *Komagataeibacter* bi mogla biti posljedica njegove bolje tolerancije na laboratorijske uslove kao i prisustvo sirćetne kiseline, koju povremeno stvara rod *Leuconostoc* (Moreno i Peinado, 2012), što može da inhibira rast ostalih rodova. Još jedna značajna razlika u sastavu bakterijskih zajednica između prirodnih i laboratorijskih populacija *D. subobscura* je velika zastupljenost roda *Lactobacillus* kod *D. subobscura* uzgajanih u laboratoriji (eksperiment Priroda/lab), sa manjom zastupljenošću u prirodnoj populaciji. Prisustvo ovog roda je uočeno i u roditeljskoj generaciji *D. subobscura* (eksperiment Standard/olovo F13), sa većom zastupljenošću kod mužjaka. Tokom nekoliko generacija u laboratoriji, *Lactobacillus* je nestao iz F13 generacije. Slični rezultati su primjećeni i kod *D. melanogaster*, gdje je roditeljska generacija (uglavnom ženke) pokazala prisustvo roda *Pediococcus* iz porodice Lactobacillaceae, koji je međutim nestao tokom nekoliko generacija u laboratoriji. *Lactobacillus* i *Pediococcus* metabolišu glukozu homolaktičkom fermentacijom, proizvodeći mliječnu kiselinu. Rod *Leuconostoc*, koji se pojavio u F13 generaciji kod *D. melanogaster*, pored mliječne kiseline proizvodi i etanol, CO₂, a povremeno i sirćetnu kiselinu (Moreno i Peinado, 2012). Svi navedeni rodovi su tolerantni na nizak pH i visoku koncentraciju etanola, ali su osjetljivi na sirćetnu kiselinu, koja je važan faktor stresa i inhibira rast mikroorganizama, što je stvorilo prednost za razvoj rodova *Acetobacter* i *Komagataeibacter* u F13 generaciji (Nie i sar., 2017).

Pokazalo se da je izloženost olovu važan faktor u oblikovanju sastava bakterijskih zajednica kod različitih vrsta (Wu i sar., 2016; Xia i sar., 2018a). Dominacija roda *Komagataeibacter* u F13 potomstvu kod *D. subobscura* koja je uzgajana na olovnom supstratu ukazuje da *Komagataeibacter* toleriše prisustvo olova u većoj mjeri nego bilo koji drugi bakterijski rod prisutan kod *Drosophila*. Ovaj rod je kompenzovao odsustvo svih ostalih rodova koji su bili prisutni u roditeljskoj generaciji, što ukazuje na njegov veliki značaj za bakterijske zajednice povezane sa *Drosophila*. *Acetobacter* se takođe pokazao kao rod koji dobro toleriše olovo, ponekad čak i sa sposobnošću da adsorbuje teške metale (Gupta i Diwan, 2017). Suprotno ovim rezultatima, *Lactobacillus* i *Pediococcus* su potpuno nestali sa supstrata sa dodatim olovom tokom nekoliko generacija, što ukazuje na njihovu veoma nisku toleranciju na olovo. U Priroda/lab eksperimentu, *Chishuiella* i *Prevotella* su bili dominantni rodovi kod *D. subobscura* iz prirode, dok su *Fructobacillus* i *Wohlfahrtiimonas* (otkriveni samo kod *D. melanogaster*), kao i *Providencia* i *Pantoea*, bili najzastupljeniji kod *D. melanogaster* iz prirode. Rod *Providencia*, koji je veoma zastupljen kod populacija iz prirode, sadrži vrste sa različitim patogenim potencijalom i uzrokuje povećanu stopu mortaliteta kod *D. melanogaster* (Galac i Lazzaro, 2011).

Od svih rodova detektovanih metagenomskim pristupom, 11 rodova je pronađeno metodom gajenja na podlogama, ali sa izuzetkom rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc*, ostale vrste sa najvećom relativnom brojnošću dobijenom metagenomskim pristupom, nisu izolovane metodom kultivacije. Izolati roda *Lactobacillus* koji su kultivisani i iz larvi i iz odraslih jedinki obje vrste, potvrdili su da je ovaj rod prisutan u većem broju kod *D. subobscura* nego kod *D. melanogaster*. Prema metagenomskoj analizi eksperimenta

Priroda/lab, najzastupljeniji rod u uzorcima *D. melanogaster* bio je *Acetobacter*, dok je kod *D. subobscura* to bio *Gluconobacter*. Međutim, izolati koji pripadaju ovim rodovima nisu dobijeni metodom kultivacije. Ovo je još jedna potvrda da se ne mogu sve bakterije uzgajati na konvencionalnim podlogama za kulturu, jer ih karakteriše gubitak kultivabilnosti na rutinskim agar podlogama, iako su korišćene i posebne podloge (Yashiro i sar., 2011). Neki rodovi bakterijskih izolata dobijeni iz kulture nisu otkriveni metagenomskom analizom na nivou roda, već su zapravo identifikovani samo na višim taksonomskim nivoima. Na primjer, izolati *Ralstonia pickettii* su bili visoko zastupljeni kod obje vrste *Drosophila*, što je potvrđeno metagenomskim podacima koji su pokazali prisustvo porodice Burkholderiaceae u mikrobiološkim zajednicama kod obje vrste. Relativno bogata porodica kod obje vrste je bila Rhizobiaceae, predstavljena sa tri izolata, jednim *Carbophilus carboxidus* kod *D. melanogaster* i dva *Rhizobium pusense*, izolovanim iz larvi obje vrste. Pored toga, *Microbacterium* spp. izolati su detektovani kao predstavnici porodice Microbacteriaceae, prisutni samo u bakterijskoj zajednici *D. melanogaster*, što je u skladu sa metagenomskim podacima. Važno je naglasiti da iako je ova porodica u uzorcima *D. melanogaster* zastupljena sa samo 0,05%, dobijeno je 13 izolata iz odraslih jedinki i larvi. Slični obrasci su pronađeni i kod drugih kultivabilnih rodova, otkrivenih u veoma malim količinama metagenomskim pristupom.

Za razliku od drugih grupa insekata, samo su *Wolbachia* i *Spiroplasma* kao endosimbionti otkriveni u vrstama *Drosophila*, što ukazuje da su nasljedni simbionti neuobičajeni kod ovih vrsta, vjerovatno zbog snažnog urođenog imunskog odgovora koji eliminiše mnoge bakterije (Mateos i sar., 2006). Generalno, ovi simbionti mogu imati i korisne i štetne efekte na reprodukciju domaćina, omjer polova, partenogenezu, ili mogu izazvati nekompatibilnost kod ukrštanja sa neinficiranim jedinkama iste vrste domaćina (Werren i Windsor, 2000). Međutim, ovi endosimbionti kod *Drosophila* formiraju fakultativne asocijacije i prenose se maternalno, prolazeći povremeno kroz horizontalni transfer u druge domaćine. Studije na sojevima *Wolbachia* u prirodnim populacijama *D. melanogaster* pokazale su klinalnu učestalost distribucije i povezanost sa gradijentom temperature životne sredine (Kriesner i sar., 2016). Dobijeni rezultati potvrđuju prisustvo *Wolbachia* u uzorcima *D. melanogaster* i zanemarljivo prisustvo kod *D. subobscura*, i to u prirodnim populacijama, što može da bude posljedica neuspješne inicijalne infekcije u prirodi. *Wolbachia* takođe može negativno da utiče na otpornost *D. melanogaster* na prisustvo olova u supstratu, ograničavajući preživljavanje i smanjujući dužinu života (Wang i sar., 2012).

Analiza bakterijskog sastava u eksperimentu Standard/olovo F35 je ukazala na dominaciju porodice Acetobacteraceae u uzorcima *D. subobscura* i porodice Lactobacillaceae u uzorcima *D. melanogaster*. Činjenica da je 98% ASV od svih ukupnih ASV roda *Lactobacillus* pronađeno u *D. melanogaster* sugeriše da bi *Lactobacillus* mogao biti specifičan član mikrobiote vrste *D. melanogaster*. Naime, kod *D. melanogaster*, uzorak sa najvećim diverzitetom i bogatstvom bakterijskih zajednica i najvećom zastupljenošću roda *Lactobacillus*, pokazao je i najveće preživljavanje od jaja do adulta i najkraće vrijeme razvića (ženke *D. melanogaster* sa standardnog supstrata, populacija Kalna). S druge strane, uzorak koji je takođe imao veliki diverzitet, ali malo bogatstvo bakterijskih zajednica, i imao je dominantno zastupljen rod *Acetobacter*, pokazao je smanjeno preživljavanje od jaja do adulta (ženke *D. melanogaster* sa olovnog supstrata, populacija Slankamen). Pored toga, uočeno je da je kod larvi *D. melanogaster* na standardnom supstratu dominirao rod *Acetobacter*, dok je na supstratu sa

olovom njegovo prisustvo bilo značajno manje. Rod *Acetobacter* je bio prisutan u uzorcima larvi obje vrste, sa najvećom zastupljenošću na standardnom supstratu, ali je došlo do smanjenja preživljavanja od jaja do adulta kada su adulti akumulirali velike količine roda *Acetobacter*. *Lactobacillus* i *Acetobacter* se obično nalaze u laboratorijski uzgojenim *D. melanogaster* (Chandler i sar., 2011; Wong i sar., 2011; Broderick i Lemaitre, 2012). Uočene su značajne razlike u rastu i razvoju larvi *D. melanogaster*, između akseničnih larvi i onih koje su kolonizovane samo sa *Lactobacillus plantarum*, kada su jedinke uzgajane na supstratima siromašnim hranljivim materijama (Storelli i sar., 2011). Budući da u određenim uslovima prisustvo *L. plantarum* pomaže rast larvi i smanjuje vrijeme njihovog razvića, to bi mogao biti razlog bržeg razvića kod *D. melanogaster* sa standardnog supstrata iz populacije Kalna (Storelli i sar., 2011; Téfit i Leulier, 2017). Pored toga, hrana *Drosophila* sa visokim sadržajem šećera favorizuje porodicu Acetobacteraceae, dok je porodica Lactobacillaceae favorizovana od strane hrane sa visokim sadržajem složenih ugljenih hidrata, npr. hrana na bazi kukuruznog brašna (Shin i sar., 2011; Storelli i sar., 2011).

U eksperimentu Standard/olovo F35 su ispitivane osobine životne istorije. Obje ispitivane osobine su značajno varirale između populacija i zadržale sličan obrazac kao diverzitet mikrobiote kod *D. melanogaster* na standardnom supstratu, gdje je preživljavanje od jaja do adulta bilo veće u populaciji Kalna u poređenju sa Slankamenom. *D. subobscura* nije pokazala značajne razlike u preživljavanju od jaja do adulta u pogledu porijekla populacija, kao ni sastava supstrata, što je takođe uočeno u studiji Tanasković i sar. (2015). Sa druge strane, rezultati za dužinu razvića su pokazali da je kod *D. subobscura* došlo do značajnijih promjena u ovoj osobini u korelaciji sa porijeklom populacije i sastavom supstrata, nego kod *D. melanogaster*. Naime, dužina razvića je značajno varirala između mužjaka i ženki *D. melanogaster* na olovnom supstratu u okviru svake populacije, pri čemu su mužjaci imali duže razviće u poređenju sa ženkama. Kod *D. subobscura* su uočene značajne razlike u dužini razvića kod oba pola na standardnom supstratu između različitih populacija, pri čemu je i mužjacima i ženkama porijeklom iz Slankamena bilo potrebno više vremena da se razviju u odnosu na one koji vode porijeklo iz Kalne. Ovo bi moglo biti posljedica preadaptacije na zagađenu životnu sredinu, pošto je prema analizama zemljišta Kalna zagađenija oblast u poređenju sa Slankamenom u pogledu pojedinih metala zbog prethodnog postojanja rudnika uranijuma na njenoj teritoriji (Nikolov i sar., 2014). Kada su analizirani pojedinačno, mužjaci i ženke kod *D. melanogaster* nisu pokazali značajne razlike u dužini razvića u pogledu porijekla ni na jednom od supstrata. Beta diverzitet je pokazao da su razlike u bakterijskom diverzitetu bile najizraženije na nivou vrste, ali je takođe otkrio da su bakterijske zajednice larvi *D. melanogaster* sličnije uzorcima odraslih *D. subobscura*, nego *D. melanogaster*. Uzorci *D. subobscura* su pokazali snažno grupisanje i time ukazali na manji uticaj izloženosti olovu na variranje u bakterijskom sastavu. Razlog bi mogla biti povećana zastupljenosti roda *Komagataeibacter* u uzorcima uzgajanim na supstratu sa dodatim olovom, budući da je on okarakterisan kao dobar potencijalni probiotik zbog visoke stope konverzije glukoze i visoke stope preživljavanja u prisustvu kiselog pH i žučnih soli (Lavasani i sar., 2019).

Pored činjenice da je dokazano da olovo na različite načine utiče na osobine životne istorije kod različitih vrsta beskičmenjaka (Ali i sar., 2019; Monchanin i sar., 2021), smanjeno preživljavanje *D. melanogaster* na supstratu sa dodatim olovom u poređenju sa *D. subobscura*, može biti posljedica brzog razvića (Chippindale i sar., 1997; Prasad i sar., 2000) i prisustva

endosimbiotske bakterije *Wolbachia*, za koju je takođe potvrđeno da utiče na crijevnu mikrobiotu (Simhadri i sar., 2017; Ye i sar., 2017). Kratko vrijeme razvića može da ima različit uticaj na fitnes, pored smanjenog preživljavanja od jaja do adulta, kao što je niža otpornost na patogene (Modak i sar., 2009), smanjeno skladištenje metabolita u larvama i smanjena veličina adultnih jedinki (Chippindale i sar., 1997).

Faktor koji je u velikoj mjeri uključen u oblikovanje mikrobiote *Drosophila* je svakako različita biologija vrsta. Pošto su bakterijske zajednice pod velikim uticajem faktora životne sredine, laboratorijske linije obje vrste *Drosophila* koje su korišćene u ovoj studiji su održavane pod istim kontrolisanim uslovima u pogledu temperature, vlažnosti, gustine populacije, sadržaja i količine hranljivog supstrata i veličine flakona/teglica, iako ovi uslovi nisu bili podjednako optimalni za obje vrste. Tako na primjer, suvi kvasac je morao da se doda na površinu supstrata da bi se ženka *D. subobscura* omogućilo da polaže jaja, što je predstavljalo suboptimalni uslov za *D. melanogaster*. Osim toga, *D. subobscura* posjeduje jedinstvene elemente u ritualu udvaranja mužjaka, gdje mužjak koji se udvara ženki ispruži svoj proboscis da bi stupio u kontakt sa proboscisom njegove potencijalne partnerke i daje joj kap sadržaja iz proširenog dijela jednjaka (engl. *crop*) (Immonen i sar., 2009).

Posebno je važno istaći razlike u optimalnoj temperaturi uzgajanja *D. melanogaster* i *D. subobscura*, budući da je temperatura jedan od značajnih faktora koji mogu da utiču na mikrobiotu domaćina (Sepulveda i Moeller, 2020). *D. melanogaster* se uspješno gaji na temperaturama od 19 do 25 °C, za razliku od *D. subobscura*, koja se uspješno gaji na nižim temperaturama i kojoj je 19 °C optimalna temperatura za uzgoj u laboratoriji. U istraživanju Jaramillo i Castañeda (2021), jedinke vrste *D. subobscura* koje su bile izložene povišenoj temperaturi su pokazale promjene u diverzitetu i strukturi bakterija u poređenju sa jedinkama koje nisu bile pod takvim stresom, što bi dalje moglo imati važne posljedice na fitnes domaćina. Razlike u diverzitetu mikrobiote pri različitim temperaturama su uočene i kod *D. melanogaster*, gdje je uočeno povećano prisustvo roda *Wolbachia* na nižim temperaturama, dok je na višim temperaturama dominirala porodica Acetobacteraceae (Moghadam i sar., 2018). Pored temperature, postoje brojne razlike između ispitivanih vrsta, poput razlika u ponašanju prilikom parenja, odabiru staništa, disperziji, odgovoru na stresne faktore iz životne sredine i slično. Parenje jedinki *D. subobscura* u velikoj mjeri zavisi od svjetlosti i jedinke ove vrste se ne pare u mraku (Marinković i Andjelković, 1972), dok se jedinke *D. melanogaster* u najvećoj mjeri pare nezavisno od osvijetljenosti (Shahandeh i sar., 2020). Sa tim je u vezi i izbor staništa kod obje vrste, što predstavlja jedan od bitnih faktora vezanih za adaptivnu vrijednost populacije i njenu struktuiranost, gdje se ključnim faktorom za odabir staništa smatra stepen osvijetljenosti (Kekic i sar., 1980; Rieger i sar., 2007). Istraživanjem dnevne aktivnosti *D. subobscura* i stope disperzije (Andjelković i sar., 1985) pokazano je da je za disperziju presudna kombinacija ekoloških faktora, a ne linearna zavisnost od pojedinačnih faktora. Međutim, tek naknadnim utvrđivanjem promjena genetičke varijabilnosti, diskutuje se detaljnije o pretpostavkama o disperziji i specifičnosti staništa. Uporedo sa praćenjem vremenske i prostorne genetičke varijabilnosti na nivou inverzionog polimorfizma, rezultati istraživanja Stamenkovic-Radak i sar. (2008b) pokazuju promjenljivost efektivne veličine populacije *D. subobscura* tokom godina, ali i pojavu do tada nedetektovanih složenih hromozomskih aranžmana, što usmjerava populaciono-genetička istraživanja ka konzervacionoj genetici, jer efektivna veličina populacija iz različitih sredina,

uz praćenje genetičke varijabilnosti, daje odgovore o evolucionom potencijalu populacija. Sa dostupnošću genomske sekvenci, populaciona genetika pomjera svoj fokus sa istraživanja pojedinačnih lokusa na genomski pristup koji se fokusira na cijele genome.

Inicijalne studije koje su koristile fenotipske varijacije (Capy i sar., 1986), hromozomske inverzije (Sturtevant, 1917), polimorfizme dužine restrikcionih fragmenata (Begun i Aquadro, 1993) i alozimske polimorfizme (David, 1982), ukazivale su na to da su populacije *D. melanogaster* diferencirane. Kasnija istraživanja genetičkog diverziteta *D. melanogaster* su pretpostavila da ona vodi porijeklo iz Subsaharske Afrike (Lachaise i sar., 1988), a naknadno uzorkovanje sa područja Afrike je doprinijelo preciznijem razumijevanju njene genetičke varijabilnosti (Pool i sar., 2012). Smatra se da je *D. melanogaster* počela da se širi na sjever u skladu sa povlačenjem posljednjeg ledenog doba (David i Capy, 1988), što je rezultiralo uskim grlom populacije van Afrike. *D. melanogaster* je kolonizovala Sjevernu Ameriku i Australiju u posljednjih nekoliko stotina godina, a smatra se da je formiranje izvedenih populacija u umjerenim regionima imalo za rezultat niz klimatskih adaptacija (Boulétreau-Merle i sar., 2003; Schmidt i sar., 2005). Na fenotipskom nivou, klonalne varijacije su dokumentovane za brojne glavne osobine životne istorije, uključujući dužinu razvika, veličinu tijela, fekunditet, otpornost na stres i životni vijek (James i Partridge, 1995; Mitrovski i Hoffmann, 2001; De Jong i Bochdanovits, 2003; Schmidt i sar., 2005). Skup podataka dobijen u istraživanju Kapun i sar. (2021) doprinosi boljem razumijevanju genomske otisaka koji leže u osnovi globalne i lokalne adaptacije, uključujući detaljniji pogled na selektivne promjene, njihovo evoluciono porijeklo i distribuciju. Sa druge strane, *D. subobscura* je tipično Palearktička vrsta koja se prvi put van tog područja pojavljuje u Čileu (1978. godine) i nekoliko godina nakon toga se vrlo uspješno širi do zapadnog dijela Severne Amerike i Kanade, gdje te populacije oslikavaju distribuciju hromozomskih aranžmana populacija sa Iberijskog poluostrva, odakle se i smatra da potiču. Analizom efekta sredinskog (zagađenje olovom) i genomske stresa na razvojnu homeostazu, rezultati genetičke i fenotipske varijabilnosti kod *D. subobscura* u velikoj mjeri objašnjavaju mehanizme kojima se organizmi i populacije prilagođavaju uslovima promjene životne sredine ili narušavanja genomske homeostaze (Stamenkovic-Radak i sar., 2008a). Vremenska i prostorna varijabilnost u učestalosti hromozomskih aranžmana koji se javljaju na svih pet hromozoma kod *D. subobscura* je pokazala da ova vrsta može biti jako dobar indikator promjena u životnoj sredini (Balanyà i sar., 2009). Inverzioni polimorfizam kod *D. subobscura* jasno pokazuje adaptivne karakteristike u odgovoru na različite faktore iz životne sredine, a jedan od njih je svakako i prisustvo teških metala, budući da je utvrđeno da su pojedini hromozomski aranžmani povezani upravo sa adaptivnim procesima otpornosti na olovo (Kalajdzic i sar., 2006). U istraživanju Kenig i sar. (2015) je pokazano da su promjene parametara inverzionog polimorfizma, koje mogu biti u pozitivnoj ili negativnoj korelaciji sa prisustvom olova u supstratu, najvjerovatnije rezultat epistatičkog ili aditivnog efekta gena koji su prisutni u inverzijama.

Mjerenje sadržaja olova ICP-OES metodom kod *D. melanogaster* i *D. subobscura* koje su održavane 35 generacija na standardnom supstratu i supstratu sa dodatim olovom, pokazalo je da je jedinke *D. subobscura* akumuliraju više olova nego *D. melanogaster*. Količina akumuliranog olova je bila veća kod mužjaka nego kod ženki kod *D. subobscura*, dok je kod *D. melanogaster* to bilo suprotno. Akumulacija i deponovanje štetnih materija je jedan od načina da se prevaziđu njihovi štetni efekti, što se ogleda u tome da *D. subobscura* nije pokazala

razlike u prezivljavanju od jaja do adulta. Otpornost *D. subobscura* na povećanu akumulaciju olova mogla bi biti posljedica visoke zastupljenosti roda *Komagataeibacter*, koji bi mogao biti primjer stabilne bakterije koja kolonizuje crijeva *D. subobscura*, pošto je dokazano da ima jake antioksidativne sposobnosti *in vitro* (Jiang i sar., 2019) i smatra se da je dobar probiotički kandidat (Lavasani i sar., 2019). Iako je vrsta *D. subobscura* pokazala manje bogatstvo i manji diverzitet mikrobiote (populacija Kalna, oba pola i oba supstrata), uzorci u kojima je bio dominantan rod *Komagataeibacter*, uglavnom su održali slične nivoe preživljavanja od jaja do adulta na oba supstrata. U eksperimentu Standard/olovo F13 je uočeno povećanje zastupljenosti roda *Komagataeibacter* u laboratorijskim gajenim mušicama nakon 13 generacija, gdje se njegova brojnost drastično povećala na supstratu sa dodatim olovom, ukazujući na njegovu veću toleranciju na teške metale od ostalih članova mikrobiote. Nakon 35 generacija, njegova visoka zastupljenost je zadržana na supstratu sa dodatim olovom, što je pomoglo dobru adaptaciju vrste *D. subobscura* na teške metale. Uzevši u obzir da mikrobiota digestivnog trakta *Drosophila* predstavlja bakterijsku zajednicu niskog diverziteta čije vrste mogu da se nađu u neposrednom okruženju domaćina, ali i da se mikrobiota iz crijeva *Drosophila* razlikuje od one iz fecesa (Blum i sar., 2013; Fink i sar., 2013), postoje indicije da *Drosophila* ima određeni nivo kontrole nad bakterijama koje nastanjuju njen digestivni trakt (Chandler i sar., 2011; Wang i sar., 2019) i da je to upravo način održavanja visoke zastupljenosti roda *Komagataeibacter* kod *D. subobscura*.

Taksonomskom analizom je utvrđeno da su svi rijetki rodovi (sa zastupljenošću manjom od 1%) kod *D. subobscura* prisutni samo u larvama, pri čemu su *Staphylococcus* i *Acinetobacter* bili prisutni na supstratu sa dodatim olovom, a *Sphingomonas*, *Vibrionimonas* i rod iz porodice Xanthobacteraceae su bili prisutni kod larvi sa oba supstrata. Zanimljivo je da je kod *D. melanogaster* većina ovih rodova bila skoro potpuno odsutna u larvama sa oba supstrata, ali i kod većine odraslih jedinki sa supstrata sa dodatim olovom. Ovi rezultati ukazuju na različitu dinamiku razvića, kao i na varijabilnost u korišćenju supstrata i degradaciji od strane larvi kod obje vrste. Ovo takođe implicira modulaciju u adaptivnim strategijama u različitim uslovima životne sredine kod dvije vrste *Drosophila*.

Vrste *D. melanogaster* i *D. subobscura* pokazuju različite obrasce prilagođavanja na promjene u sastavu supstrata u pogledu razlika u diverzitetu i sastavu mikrobiote usljed različitih evolucionih istorija i biologije ispitivanih vrsta. Budući da su poređene populacije iz dvije u različitom stepenu zagađene sredine, istorijski događaji, ali i selekcion procesi su važni za predviđanje evolucionog potencijala populacija.

6. Zaključci

U ovom istraživanju su ispitivane razlike u sastavu i diverzitetu mikrobiote između *D. melanogaster* i *D. subobscura* iz prirode i njihovog potomstva uzgojenog u laboratoriji pod istim uslovima na početku i nakon 13 generacija laboratorijski kontrolisanog uzgoja korišćenjem standardnog supstrata i supstrata sa dodatim olovo-acetatom. Nakon 35 generacija je procijenjen uticaj promjena u sastavu i diverzitetu mikrobiote na osobine životne istorije, i to preživljavanje od jaja do adulta i dužinu razvića.

U skladu sa prethodno postavljenim ciljevima istraživanja i na osnovu rezultata koji su dobijeni u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Metodom kultivacije bakterija na selektivnim mikrobiološkim podlogama nije detektovana većina članova mikrobiote koji su metagenomskom analizom dobijeni sa najvećom relativnom zastupljenošću. Metagenomska analiza daje potpune informacije o prisustvu i promjenama u sastavu mikrobiote i pogodna je za studije eksperimentalne evolucije praćenja interakcija između domaćina i bakterijskih zajednica.
- Ukupan diverzitet i bogatstvo mikrobiote su smanjeni kod laboratorijski uzgojenih *D. melanogaster* i *D. subobscura* u odnosu na jedinke iz prirode, a smanjivali su se i tokom generacija u standardnim laboratorijskim uslovima.
- *D. subobscura* je inicijalno u laboratorijskim uslovima pokazala veći diverzitet i bogatstvo mikrobiote od *D. melanogaster*, kao posljedica populacijski-specifičnog odgovora na laboratorijske uslove, ali je tokom generacija održavanja u laboratoriji *D. melanogaster* pokazala veće vrijednosti mjera alfa diverziteta.
- Diverzitet mikrobiote se povećao kod obje vrste nakon 13 generacija uzgajanja na supstratu sa olovo-acetatom u odnosu na roditeljsku generaciju, a nakon 35 generacija, bogatstvo vrsta kod *D. subobscura* je bilo značajno manje u odnosu na *D. melanogaster*, ali i u uzorcima sa olovnog supstrata za obje vrste.
- Kod jedinki uzorkovanih direktno iz prirode, rod *Acetobacter* je bio visoko zastupljen kod *D. melanogaster*, dok je rod *Gluconobacter* bio dominantan kod *D. subobscura*.
- Nakon višegeneracijskog uzgajanja *D. subobscura* u laboratoriji na oba supstrata, identifikovana je visoka zastupljenost bakterijskog roda *Komagataeibacter*, sa većom zastupljenošću na supstratu sa dodatim olovom. Dominacija ovog roda u prisustvu olova ukazuje na njegovu značajniju toleranciju na povišene koncentracije olova u odnosu na ostale članove mikrobiote.
- Rod *Komagataeibacter* nije uobičajeni član mikrobiote *Drosophila* i nije bio prisutan u roditeljskoj generaciji *D. subobscura*. Budući da su sve jedinke u laboratoriji održavane pod istim kontrolisanim uslovima, njegova velika zastupljenost u eksperimentalnim uslovima u F13 i F35 generacijama ukazuje na kontrolu mikrobiote od strane domaćina.
- Rod *Acetobacter* je bio visoko zastupljen kod larvi obje ispitivane vrste *Drosophila*, sa većom zastupljenošću kod *D. subobscura*, i generalno na standardnom supstratu.

- Obje ispitivane osobine životne historije su značajno varirale među populacijama pri čemu je kod *D. melanogaster* na standardnom supstratu preživljavanje od jaja do adulta bilo veće u populaciji Kalna u poređenju sa populacijom Slankamen, dok *D. subobscura* nije pokazala značajne razlike u pogledu porijekla populacija. Sa druge strane, kod *D. subobscura* je došlo do značajnijih promjena u dužini razvića u korelaciji sa porijeklom populacije, nego kod *D. melanogaster*.
- Razlike između polova su imale uticaj na osobine životne historije kod *D. melanogaster*, gdje je uočeno značajno variranje u dužini razvića između mužjaka i ženki sa olovnog supstrata u obje populacije, dok je kod *D. subobscura* uočena razlika u okviru oba pola na kontrolnom supstratu iz različitih populacija, što ukazuje da uticaj porijekla populacije i pola na osobine životne historije može biti specifičan za vrstu.
- Prisustvo olova je izazvalo promjene u dužini razvića kod *D. subobscura*, ali je održalo preživljavanje od jaja do adulta na sličnom nivou, što se može objasniti dominacijom roda *Komagataeibacter* u mikrobioti *D. subobscura*. Preživljavanje od jaja do adulta je povećano kod *D. subobscura* na standardnom supstratu kada je *Komagataeibacter* visoko zastupljen, što ukazuje da bi on mogao biti značajan član mikrobiote *D. subobscura* u prevazilaženju stresa iz životne sredine.

Opšti zaključak

- Istraživanja uticaja mikrobiote na adaptivni odgovor populacija domaćina na povećanje koncentracija teških metala je od značaja sa aspekta konzervacione i ekološke genetike. Dalja istraživanja bi mogla uključiti temperaturu i kombinaciju teških metala, kao abiotičke faktore i identifikaciju specifičnih članova mikrobiote koji, pojedinačno ili kroz interakcije, utiču na adaptacije.

7. Literatura

- Al-Momani, F. A., i Massadeh, A. M. (2005). Effect of different heavy-metal concentrations on *Drosophila melanogaster* larval growth and development. *Biological Trace Element Research*, 108(1), 271-277. doi:10.1385/BTER:108:1-3:271
- Ali, S., Ullah, M., Saeed, M. F., Khalid, S., Saqib, M., Arshad, M., Afzal, M., i Damalas, C. (2019). Heavy metal exposure through artificial diet reduces growth and survival of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 14426–14434. doi:10.1007/s11356-019-04792-0
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., i Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 11(10), 697-709. doi:10.1038/nrg2844
- Anand, A. A. P., Vennison, S. J., Sankar, S. G., Prabhu, D. I. G., Vasani, P. T., Raghuraman, T., Geoffrey, C. J., i Vendan, S. E. (2010). Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *Journal of insect science (Online)*, 10, 107-107. doi:10.1673/031.010.10701
- Anderson, K. E., Russell, J. A., Moreau, C. S., Kautz, S., Sullam, K. E., Hu, Y., Basinger, U., Mott, B. M., Buck, N., i Wheeler, D. E. (2012). Highly similar microbial communities are shared among related and trophically similar ant species. *Molecular Ecology*, 21(9), 2282-2296. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05464.x
- Andjelković, M., Stamenković-Radak, M., i Sekulić, M. D. (1985). The daily activity rhythm of *D. subobscura* at Ravnište (Jastrebac) locality, Yugoslavia. *Acta entomologica Jugoslavica*, 21, 32-39.
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., i Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *science*, 307(5717), 1915-1920. doi:10.1126/science.1104816
- Bahadorani, S., i Hilliker, A. J. (2009). Biological and Behavioral Effects of Heavy Metals in *Drosophila melanogaster* Adults and Larvae. *Journal of Insect Behavior*, 22(5), 399-411. doi:10.1007/s10905-009-9181-4
- Bahadorani, S., Mukai, S., Egli, D., i Hilliker, A. J. (2010). Overexpression of metal-responsive transcription factor (MTF-1) in *Drosophila melanogaster* ameliorates life-span reductions associated with oxidative stress and metal toxicity. *Neurobiology of Aging*, 31(7), 1215-1226. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.08.001
- Balali-Mood, M., Naseri, K., Tahergorabi, Z., Khazdair, M. R., i Sadeghi, M. (2021). Toxic Mechanisms of Five Heavy Metals: Mercury, Lead, Chromium, Cadmium, and Arsenic. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 643972. doi:10.3389/fphar.2021.643972
- Balanyà, J., Huey, R., Gilchrist, G., i Serra, L. (2009). The chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura*: a microevolutionary weapon to monitor global change. *Heredity*, 103(5), 364-367. doi:10.1038/hdy.2009.86
- Ballan-Dufrançais, C. (2002). Localization of metals in cells of pterygote insects. *Microscopy research and technique*, 56(6), 403-420. doi:10.1002/jemt.10041
- Basset, Y., Cizek, L., Cuénoud, P., Didham, R. K., Guilhaumon, F., Missa, O., Novotny, V., Ødegaard, F., Roslin, T., i Schmidl, J. (2012). Arthropod diversity in a tropical forest. *Science*, 338(6113), 1481-1484. doi:10.1126/science.1226727
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 155-189. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121041
- Beckenbach, A. T., i Prevosti, A. (1986). Colonization of North America by the European Species, *Drosophila subobscura* and *D. ambigua*. *The American Midland Naturalist*, 115(1), 10-18. doi:10.2307/2425832

- Begun, D. J., i Aquadro, C. F. (1993). African and North American populations of *Drosophila melanogaster* are very different at the DNA level. *Nature*, 365(6446), 548-550. doi:10.1038/365548a0
- Behmer, S., Lloyd, C., Raubenheimer, D., Stewart-Clark, J., Knight, J., Leighton, R., Harper, F., i Smith, J. (2005). Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Functional Ecology*, 19(1), 55-66. doi:10.1111/j.0269-8463.2005.00943.x
- Benjamini, Y., i Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300.
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., Mitter, B., Ryan, M., Sarand, I., Smidt, H., Schelkle, B., Roume, H., Kiran, G. S., Selvin, J., Souza, R. S. C. d., van Overbeek, L., Singh, B. K., Wagner, M., Walsh, A., Sessitsch, A., i Schloter, M. (2020). Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 103. doi:10.1186/s40168-020-00875-0
- Beribaka, M., Jelić, M., Tanasković, M., Lazić, C., i Stamenković-Radak, M. (2021a). Life History Traits in Two *Drosophila* Species Differently Affected by Microbiota Diversity under Lead Exposure. *Insects*, 12(12), 1122. doi:10.3390/insects12121122
- Beribaka, M. B., Dimkić, I. Z., Jelić, M. Đ., Stanković, S. M., Pržulj, N. M., Anđelković, M. L., i Stamenković-Radak, M. M. (2021b). Altered diversity of bacterial communities in two *Drosophila* species under laboratory conditions and lead exposure. *Archives of Biological Sciences*, 73(1), 17-29. doi:10.2298/ABS200911054B
- Bickel, S., i Or, D. (2020). Soil bacterial diversity mediated by microscale aqueous-phase processes across biomes. *Nature Communications*, 11(1), 1-9. doi:10.1038/s41467-019-13966-w
- Blatch, S., Meyer, K. W., i Harrison, J. F. (2010). Effects of dietary folic acid level and symbiotic folate production on fitness and development in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Fly*, 4(4), 312-319. doi:10.4161/fly.4.4.13258
- Blum, J. E., Fischer, C. N., Miles, J., i Handelsman, J. (2013). Frequent replenishment sustains the beneficial microbiome of *Drosophila melanogaster*. *MBio*, 4(6), e00860. doi:10.1128/mBio.00860-13
- Boulétreau-Merle, J., Fouillet, P., i Varaldi, J. (2003). Divergent strategies in low temperature environment for the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: overwintering in extension border areas of France and comparison with African populations. *Evolutionary Ecology*, 17(5), 523-548. doi:10.1023/B:EVEC.0000005632.21186.21
- Bourioug, M., Gimbert, F., Alaoui-Sehmer, L., Benbrahim, M., Aleya, L., i Alaoui-Sossé, B. (2015). Sewage sludge application in a plantation: effects on trace metal transfer in soil-plant-snail continuum. *Science of The Total Environment*, 502, 309-314. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.09.022
- Breton, J., Daniel, C., Dewulf, J., Pothion, S., Froux, N., Sauty, M., Thomas, P., Pot, B., i Foligné, B. (2013). Gut microbiota limits heavy metals burden caused by chronic oral exposure. *Toxicology Letters*, 222(2), 132-138. doi:10.1016/j.toxlet.2013.07.021
- Briffa, J., Sinagra, E., i Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9), e04691. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04691
- Briones-Roblero, C. I., Rodríguez-Díaz, R., Santiago-Cruz, J. A., Zúñiga, G., i Rivera-Orduña, F. N. (2017). Degradation capacities of bacteria and yeasts isolated from the gut of

- Dendroctonus rhizophagus (Curculionidae: Scolytinae). *Folia microbiologica*, 62(1), 1-9. doi:10.1007/s12223-016-0469-4
- Broderick, N. A., i Lemaitre, B. (2012). Gut-associated microbes of Drosophila melanogaster. *Gut Microbes*, 3(4), 307-321. doi:10.4161/gmic.19896
- Brummel, T., Ching, A., Seroude, L., Simon, A. F., i Benzer, S. (2004). Drosophila lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(35), 12974-12979. doi:10.1073/pnas.0405207101
- Brune, A. (2014). Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 168-180. doi:10.1038/nrmicro3182
- Burger, J. M., Hwangbo, D. S., Corby-Harris, V., i Promislow, D. E. (2007). The functional costs and benefits of dietary restriction in Drosophila. *Aging cell*, 6(1), 63-71. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00261.x
- Burke, M. K., i Rose, M. R. (2009). Experimental evolution with Drosophila. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(6), R1847-R1854. doi:10.1152/ajpregu.90551.2008
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., i Holmes, S. P. (2016a). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869
- Callahan, B. J., Sankaran, K., Fukuyama, J. A., McMurdie, P. J., i Holmes, S. P. (2016b). Bioconductor Workflow for Microbiome Data Analysis: from raw reads to community analyses. *F1000Research*, 5, 1492. doi:10.12688/f1000research.8986.2
- Capy, P., David, J. R., Allemand, R., Carton, Y., Febvay, G., i Kermarec, A. (1986). Genetic analysis of Drosophila melanogaster in the French West Indies and comparison with populations from other parts of the world. *Genetica*, 69(3), 167-176. doi:10.1007/BF00133519
- Capy, P., i Gibert, P. (2004). Drosophila Melanogaster, Drosophila Simulans: so Similar yet so Different. *Genetica*, 120(1), 5-15. doi:10.1023/B:GENE.0000017626.41548.97
- Carrier-Belleau, C., Drolet, D., McKindsey, C. W., i Archambault, P. (2021). Environmental stressors, complex interactions and marine benthic communities' responses. *Scientific reports*, 11(1), 4194. doi:10.1038/s41598-021-83533-1
- Carroll, S. P., Jørgensen, P. S., Kinnison, M. T., Bergstrom, C. T., Denison, F. R., Gluckman, P., Smith, T. B., Strauss, S. Y., i Tabashnik, B. E. (2014). Applying evolutionary biology to address global challenges. *Science*, 346(6207), 1245993. doi:10.1126/science.1245993
- Chandler, J. A., Morgan Lang, J., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., i Kopp, A. (2011). Bacterial Communities of Diverse Drosophila Species: Ecological Context of a Host-Microbe Model System. *PLOS Genetics*, 7(9), e1002272. doi:10.1371/journal.pgen.1002272
- Chaplinska, M., Gerritsma, S., Dini-Andreote, F., Falcao Salles, J., i Wertheim, B. (2016). Bacterial Communities Differ among Drosophila melanogaster Populations and Affect Host Resistance against Parasitoids. *PLOS ONE*, 11(12), e0167726. doi:10.1371/journal.pone.0167726
- Chaston, J. M., Newell, P. D., i Douglas, A. E. (2014). Metagenome-wide association of microbial determinants of host phenotype in Drosophila melanogaster. *MBio*, 5(5), e01631. doi:10.1128/mBio.01631-14
- Chaston, J. M., Dobson, A. J., Newell, P. D., i Douglas, A. E. (2015). Host Genetic Control of the Microbiota Mediates the Drosophila Nutritional Phenotype. *Applied and environmental microbiology*, 82(2), 671-679. doi:10.1128/AEM.03301-15
- Cheung, W. W., i Purcell, A. H. (1993). Ultrastructure of the digestive system of the Leafhopper Euscelidius variegatus Kirshbaum (Homoptera: Cicadellidae), with and without congenital bacterial infections. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 22(1), 49-61.

- Chippindale, A. K., Alipaz, J. A., Chen, H.-W., i Rose, M. R. (1997). Experimental evolution of accelerated development in *Drosophila*. 1. Developmental speed and larval survival. *Evolution*, *51*(5), 1536-1551. doi:10.1111/j.1558-5646.1997.tb01477.x
- Chouaia, B., Rossi, P., Epis, S., Mosca, M., Ricci, I., Damiani, C., Ulissi, U., Crotti, E., Daffonchio, D., i Bandi, C. (2012). Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts. *BMC microbiology*, *12*(1), 1-8. doi:10.1186/1471-2180-12-S1-S2
- Claesson, M. J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., De Vos, W. M., Ross, R. P., i O'Toole, P. W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PloS one*, *4*(8), e6669. doi:10.1371/journal.pone.0006669
- Clark, R. I., Salazar, A., Yamada, R., Fitz-Gibbon, S., Morselli, M., Alcaraz, J., Rana, A., Rera, M., Pellegrini, M., i William, W. J. (2015). Distinct shifts in microbiota composition during *Drosophila* aging impair intestinal function and drive mortality. *Cell reports*, *12*(10), 1656-1667. doi:10.1016/j.celrep.2015.08.004
- Colman, D. R., Toolson, E. C., i Takacs-Vesbach, C. D. (2012). Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities? *Molecular Ecology*, *21*(20), 5124-5137. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05752.x
- Coon, K. L., Brown, M. R., i Strand, M. R. (2016). Gut bacteria differentially affect egg production in the anautogenous mosquito *Aedes aegypti* and facultatively autogenous mosquito *Aedes atropalpus* (Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, *9*(1), 1-12. doi:10.1186/s13071-016-1660-9
- Corby-Harris, V., Pontaroli, A. C., Shimkets, L. J., Bennetzen, J. L., Habel, K. E., i Promislow, D. E. (2007). Geographical distribution and diversity of bacteria associated with natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Applied and environmental microbiology*, *73*(11), 3470-3479. doi:10.1128/AEM.02120-06
- Coryell, M., McAlpine, M., Pinkham, N. V., McDermott, T. R., i Walk, S. T. (2018). The gut microbiome is required for full protection against acute arsenic toxicity in mouse models. *Nature Communications*, *9*(1), 1-9. doi:10.1038/s41467-018-07803-9
- Côté, I. M., Darling, E. S., i Brown, C. J. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *283*(1824), 20152592. doi:10.1098/rspb.2015.2592
- Cox, C. R., i Gilmore, M. S. (2007). Native microbial colonization of *Drosophila melanogaster* and its use as a model of *Enterococcus faecalis* pathogenesis. *Infection and immunity*, *75*(4), 1565-1576. doi:10.1128/IAI.01496-06
- Coyte, K. Z., Schluter, J., i Foster, K. R. (2015). The ecology of the microbiome: Networks, competition, and stability. *science*, *350*(6261), 663-666. doi:10.1126/science.aad2602
- Cutter, A. D., i Payseur, B. A. (2013). Genomic signatures of selection at linked sites: unifying the disparity among species. *Nature Reviews Genetics*, *14*(4), 262-274. doi:10.1038/nrg3425
- David, J. R. (1982). Latitudinal variability of *Drosophila melanogaster*: allozyme frequencies divergence between European and Afrotropical populations. *Biochemical genetics*, *20*(7), 747-761. doi:10.1007/BF00483971
- David, J. R., i Capy, P. (1988). Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends in Genetics*, *4*(4), 106-111. doi:10.1016/0168-9525(88)90098-4
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., i Fischbach, M. A. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559-563. doi:10.1038/nature12820

- De Jong, G., i Bochdanovits, Z. (2003). Latitudinal clines in *Drosophila melanogaster*: Body size, allozyme frequencies, inversion frequencies, and the insulin-signalling pathway. *Journal of genetics*, 82(3), 207-223. doi:10.1007/BF02715819
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., i Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164), 811-818. doi:10.1038/nature06245
- Dethlefsen, L., i Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4554-4561. doi:10.1073/pnas.1000087107
- Devkota, B., i Schmidt, G. (2000). Accumulation of heavy metals in food plants and grasshoppers from the Taigetos Mountains, Greece. *Agriculture, ecosystems & environment*, 78(1), 85-91. doi:10.1016/S0167-8809(99)00110-3
- Dey, U., Chatterjee, S., i Mondal, N. K. (2016). Isolation and characterization of arsenic-resistant bacteria and possible application in bioremediation. *Biotechnology Reports*, 10, 1-7. doi:10.1016/j.btre.2016.02.002
- Dobson, A. J., Chaston, J. M., Newell, P. D., Donahue, L., Hermann, S. L., Sannino, D. R., Westmiller, S., Wong, A. C.-N., Clark, A. G., i Lazzaro, B. P. (2015). Host genetic determinants of microbiota-dependent nutrition revealed by genome-wide analysis of *Drosophila melanogaster*. *Nature communications*, 6(1), 1-9. doi:10.1038/ncomms7312
- Douglas, A. E. (2018). *Drosophila* and its gut microbes: a model for drug-microbiome interactions. *Drug discovery today. Disease models*, 28, 43-49. doi:10.1016/j.ddmod.2019.08.004
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., i Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638. doi:10.1126/science.1110591
- Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N. K., Bhatnagar, S., Eisen, J. A., i Sundaresan, V. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), E911-E920. doi:10.1073/pnas.1414592112
- Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., i Ross, R. P. (2018). The Gut Microbiota of Marine Fish. *Frontiers in microbiology*, 9, 873. doi:10.3389/fmicb.2018.00873
- Eggleton, P. (2011). An Introduction to Termites: Biology, Taxonomy and Functional Morphology. In Bignell, D. E., Roisin, Y., & Lo, N. (Eds.), *Biology of Termites: a Modern Synthesis* (pp. 1-26). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Eichler, S., i Schaub, G. (2002). Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental parasitology*, 100(1), 17-27. doi:10.1006/expr.2001.4653
- Emmett, B. D., Youngblut, N. D., Buckley, D. H., i Drinkwater, L. E. (2017). Plant Phylogeny and Life History Shape Rhizosphere Bacterial Microbiome of Summer Annuals in an Agricultural Field. *Frontiers in microbiology*, 8, 2414-2414. doi:10.3389/fmicb.2017.02414
- Engel, P., Martinson, V. G., i Moran, N. A. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(27), 11002. doi:10.1073/pnas.1202970109
- Engel, P., i Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 699-735. doi:10.1111/1574-6976.12025

- Erić, P., Jelić, M., Savić-Veselinović, M., Kenig, B., Anđelković, M., i Stamenković-Radak, M. (2019). Nucleotide diversity of Cyt b gene in *Drosophila subobscura* Collin. *Genetika*, 51(1), 213-226. doi:10.2298/GENSR1901213E
- Erkosar, B., Storelli, G., Defaye, A., i Leulier, F. (2013). Host-intestinal microbiota mutualism: "learning on the fly". *Cell host & microbe*, 13(1), 8-14. doi:10.1016/j.chom.2012.12.004
- Erkosar, B., Yashiro, E., Zajitschek, F., Friberg, U., Maklakov, A. A., van der Meer, J. R., i Kawecki, T. J. (2018). Host diet mediates a negative relationship between abundance and diversity of *Drosophila* gut microbiota. *Ecology and evolution*, 8(18), 9491-9502. doi:10.1002/ece3.4444
- Fabian, D., i Flatt, T. (2012). Life History Evolution. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 24.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., i Leibel, R. L. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* 341(6141), 1237439. doi:10.1126/science.1237439
- Falconer, D. S. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. Harlow, England: Prentice Hall.
- Fast, D., Duggal, A., i Foley, E. (2018). Monoassociation with *Lactobacillus plantarum* disrupts intestinal homeostasis in adult *Drosophila melanogaster*. *MBio*, 9(4), e01114-01118. doi:10.1128/mBio.01114-18
- Ferguson, R. M. W., O'Gorman, E. J., McElroy, D. J., McKew, B. A., Coleman, R. A., Emmerson, M. C., i Dumbrell, A. J. (2021). The ecological impacts of multiple environmental stressors on coastal biofilm bacteria. *Global Change Biology*, 27(13), 3166-3178. doi:10.1111/gcb.15626
- Fink, C., Staubach, F., Kuenzel, S., Baines, J. F., i Roeder, T. (2013). Noninvasive analysis of microbiome dynamics in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Applied and environmental microbiology*, 79(22), 6984-6988. doi:10.1128/AEM.01903-13
- Fischer, C. N., Trautman, E. P., Crawford, J. M., Stabb, E. V., Handelsman, J., i Broderick, N. A. (2017). Metabolite exchange between microbiome members produces compounds that influence *Drosophila* behavior. *eLife*, 6, e18855. doi:10.7554/eLife.18855
- Flatt, T., i Schmidt, P. S. (2009). Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochimica et biophysica acta*, 1790(10), 951-962. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.010
- Flatt, T. (2011). Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 46(5), 369-375. doi:10.1016/j.exger.2010.10.008
- Flatt, T., i Heyland, A. (2011). *Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs*. New York, USA: Oxford University Press.
- Folt, C. L., Chen, C. Y., Moore, M. V., i Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnology and Oceanography*, 44(3, dio 2), 864-877. doi:10.4319/lo.1999.44.3_part_2.0864
- Fong, J. J., Sung, Y.-H., i Ding, L. (2020). Comparative Analysis of the Fecal Microbiota of Wild and Captive Beal's Eyed Turtle (*Sacalia bealei*) by 16S rRNA Gene Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 11, 570890. doi:10.3389/fmicb.2020.570890
- Fontana, A., Panebianco, C., Picchianti-Diamanti, A., Laganà, B., Cavalieri, D., Potenza, A., Pracella, R., Binda, E., Copetti, M., i Paziienza, V. (2019). Gut Microbiota Profiles Differ among Individuals Depending on Their Region of Origin: An Italian Pilot Study. *International journal of environmental research and public health*, 16(21), 4065. doi:10.3390/ijerph16214065
- Foster, K. R., i Wenseleers, T. (2006). A general model for the evolution of mutualisms. *Journal of evolutionary biology*, 19(4), 1283-1293. doi:10.1111/j.1420-9101.2005.01073.x
- Foster, K. R., Schluter, J., Coyte, K. Z., i Rakoff-Nahoum, S. (2017a). The evolution of the host microbiome as an ecosystem on a leash. *Nature*, 548(7665), 43-51. doi:10.1038/nature23292

- Foster, Z. S. L., Sharpton, T. J., i Grünwald, N. J. (2017b). Metacoder: An R package for visualization and manipulation of community taxonomic diversity data. *PLoS Computational Biology*, *13*(2), e1005404. doi:10.1371/journal.pcbi.1005404
- Frank, D. N., Amand, A. L. S., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., i Pace, N. R. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(34), 13780-13785. doi:10.1073/pnas.0706625104
- Frat, L., Chertemps, T., Pesce, E., Bozzolan, F., Dacher, M., Planelló, R., Herrero, O., Llorente, L., Moers, D., i Siaussat, D. (2021). Single and mixed exposure to cadmium and mercury in *Drosophila melanogaster*: Molecular responses and impact on post-embryonic development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *220*, 112377. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112377
- Freedman, B. (2018). *Environmental Science: A Canadian Perspective*. Halifax, NS, Canada: Dalhousie University Libraries Digital Editions.
- Fridmann-Sirkis, Y., Stern, S., Elgart, M., Galili, M., Zeisel, A., Shental, N., i Soen, Y. (2014). Delayed development induced by toxicity to the host can be inherited by a bacterial-dependent, transgenerational effect. *Frontiers in Genetics*, *5*, 27. doi:10.3389/fgene.2014.00027
- Fukatsu, T., i Hosokawa, T. (2002). Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and environmental microbiology*, *68*(1), 389-396. doi:10.1128/AEM.68.1.389-396.2002
- Galac, M. R., i Lazzaro, B. P. (2011). Comparative pathology of bacteria in the genus *Providencia* to a natural host, *Drosophila melanogaster*. *Microbes and infection*, *13*(7), 673-683. doi:10.1016/j.micinf.2011.02.005
- Gall, J. E., Boyd, R. S., i Rajakaruna, N. (2015). Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, *187*(4), 201. doi:10.1007/s10661-015-4436-3
- Gandotra, S., Bhuyan, P. M., Gogoi, D. K., Kumar, A., i Subramanian, S. (2018). Screening of nutritionally important gut bacteria from the lepidopteran insects through qualitative enzyme assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *88*(1), 329-337. doi:10.1007/s40011-016-0762-7
- Garland, T., i Rose, M. R. (2009). *Experimental Evolution: Concepts, Methods, and Applications of Selection Experiments*. Oakland, CA, USA: University of California Press.
- Gautam, P. K., Gautam, R. K., Banerjee, S., Chattopadhyaya, M., i Pandey, J. (2016). Heavy metals in the environment: fate, transport, toxicity and remediation technologies. In Deepak, P. (Ed.), *Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques* (Vol. 60, pp. 101-130). Hauppauge, NY, USA: Nova Science Publishers.
- Genta, F. A., Dillon, R. J., Terra, W. R., i Ferreira, C. (2006). Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, *52*(6), 593-601. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.02.007
- Gerritsma, S., Jalvingh, K. M., van de Beld, C., Beerda, J., van de Zande, L., Vrieling, K., i Wertheim, B. (2019). Natural and Artificial Selection for Parasitoid Resistance in *Drosophila melanogaster* Leave Different Genetic Signatures. *Frontiers in genetics*, *10*, 479-479. doi:10.3389/fgene.2019.00479
- Gill, S. R., Pop, M., Deboy, R. T., Eckburg, P. B., Turnbaugh, P. J., Samuel, B. S., Gordon, J. I., Relman, D. A., Fraser-Liggett, C. M., i Nelson, K. E. (2006). Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, *312*(5778), 1355-1359. doi:10.1126/science.1124234
- Godon, J.-J., Arulazhagan, P., Steyer, J.-P., i Hamelin, J. (2016). Vertebrate bacterial gut diversity: size also matters. *BMC Ecology*, *16*(1), 12. doi:10.1186/s12898-016-0071-2

- Goertz, S., de Menezes, A. B., Birtles, R. J., Fenn, J., Lowe, A. E., MacColl, A. D. C., Poulin, B., Young, S., Bradley, J. E., i Taylor, C. H. (2019). Geographical location influences the composition of the gut microbiota in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) at a fine spatial scale. *PLOS ONE*, *14*(9), e0222501. doi:10.1371/journal.pone.0222501
- Gómez, G. D., i Balcázar, J. L. (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *52*(2), 145-154. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00343.x
- Gong, Q., Cao, L.-J., Sun, L.-N., Chen, J.-C., Gong, Y.-J., Pu, D.-Q., Huang, Q., Hoffmann, A. A., i Wei, S.-J. (2020). Similar Gut Bacterial Microbiota in Two Fruit-Feeding Moth Pests Collected from Different Host Species and Locations. *Insects*, *11*(12). doi:10.3390/insects11120840
- Gonzalez, A., Stombaugh, J., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Gordon, J. I., i Knight, R. (2011). The mind-body-microbial continuum. *Dialogues in clinical neuroscience*, *13*(1), 55. doi:10.31887/DCNS.2011.13.1/agonzalez
- Gonzalez, A., i Bell, G. (2013). Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1610), 20120079. doi:10.1098/rstb.2012.0079
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., Beaumont, M., Van Treuren, W., Knight, R., Bell, J. T., Spector, T. D., Clark, A. G., i Ley, R. E. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, *159*(4), 789-799. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053
- Gould, A. L., Zhang, V., Lamberti, L., Jones, E. W., Obadia, B., Korasidis, N., Gavryushkin, A., Carlson, J. M., Beerenwinkel, N., i Ludington, W. B. (2018). Microbiome interactions shape host fitness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(51), E11951-E11960. doi:10.1073/pnas.1809349115
- Green, I., Diaz, A., i Tibbett, M. (2010). Factors affecting the concentration in seven-spotted ladybirds (*Coccinella septempunctata* L.) of Cd and Zn transferred through the food chain. *Environmental Pollution*, *158*(1), 135-141. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.032
- Griffiths, S. M., Antwis, R. E., Lenzi, L., Lucaci, A., Behringer, D. C., Butler, M. J. t., i Preziosi, R. F. (2019). Host genetics and geography influence microbiome composition in the sponge *Ircinia campana*. *The Journal of animal ecology*, *88*(11), 1684-1695. doi:10.1111/1365-2656.13065
- Grond, K., Sandercock, B. K., Jumpponen, A., i Zeglin, L. H. (2018). The avian gut microbiota: community, physiology and function in wild birds. *Journal of Avian Biology*, *49*(11), e01788. doi:10.1111/jav.01788
- Grześ, I. M. (2010). Ants and heavy metal pollution—a review. *European Journal of Soil Biology*, *46*(6), 350-355. doi:10.1016/j.ejsobi.2010.09.004
- Gupta, P., i Diwan, B. (2017). Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, *13*, 58-71. doi:10.1016/j.btre.2016.12.006
- Gurung, K., Wertheim, B., i Falcao Salles, J. (2019). The microbiome of pest insects: it is not just bacteria. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *167*(3), 156-170. doi:10.1111/eea.12768
- Ha, C. W. Y., i Devkota, S. (2020). The new microbiology: cultivating the future of microbiome-directed medicine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *319*(6), G639-G645. doi:10.1152/ajpgi.00093.2020
- Habineza, P., Muhammad, A., Ji, T., Xiao, R., Yin, X., Hou, Y., i Shi, Z. (2019). The Promoting Effect of Gut Microbiota on Growth and Development of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Dryophthoridae) by Modulating Its

- Nutritional Metabolism. *Frontiers in microbiology*, 10, 1212-1212. doi:10.3389/fmicb.2019.01212
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A., i Yari Khosroushahi, A. (2015). Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(4), 1056-1064. doi:10.1111/ijfs.12718
- Hales, K. G., Korey, C. A., Larracuenta, A. M., i Roberts, D. M. (2015). Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. *Genetics*, 201(3), 815-842. doi:10.1534/genetics.115.183392
- Hamady, M., i Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. *Genome research*, 19(7), 1141-1152. doi:10.1101/gr.085464.108
- Hammer, T. J., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Jaffe, S. P., i Fierer, N. (2017). Caterpillars lack a resident gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(36), 9641. doi:10.1073/pnas.1707186114
- Hansen, A. K., i Moran, N. A. (2014). The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology*, 23(6), 1473-1496. doi:10.1111/mec.12421
- Hardy, C. M., Burke, M. K., Everett, L. J., Han, M. V., Lantz, K. M., i Gibbs, A. G. (2018). Genome-Wide Analysis of Starvation-Selected *Drosophila melanogaster*-A Genetic Model of Obesity. *Molecular Biology and Evolution*, 35(1), 50-65. doi:10.1093/molbev/msx254
- Henry, L. P., Bruijning, M., Forsberg, S. K. G., i Ayroles, J. F. (2019). Can the microbiome influence host evolutionary trajectories? *bioRxiv*, 700237. doi:10.1101/700237
- Henry, Y., Overgaard, J., i Colinet, H. (2020). Dietary nutrient balance shapes phenotypic traits of *Drosophila melanogaster* in interaction with gut microbiota. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 241, 110626. doi:10.1016/j.cbpa.2019.110626
- Hereford, J. (2009). A Quantitative Survey of Local Adaptation and Fitness Trade-Offs. *The American Naturalist*, 173(5), 579-588. doi:10.1086/597611
- Hodson, M. E. (2013). Effects of heavy metals and metalloids on soil organisms. In Alloway, B. (Ed.), *Heavy metals in soils* (Vol. 22, pp. 141-160). Dordrecht: Springer.
- Hoffmann, A. A., i Sgrò, C. M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*, 470(7335), 479-485. doi:10.1038/nature09670
- Hongoh, Y. (2010). Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(6), 1145-1151. doi:10.1271/bbb.100094
- Hopkins, G. R., French, S. S., i Brodie, E. D. (2017). Interacting stressors and the potential for adaptation in a changing world: responses of populations and individuals. *Royal Society Open Science*, 4(6), 161057. doi:10.1098/rsos.161057
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M., i Fukatsu, T. (2006). Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS biology*, 4(10), e337. doi:10.1371/journal.pbio.0040337
- Houle, D. (2001). The character problem in life history evolution. In Wagner, G. P. (Ed.), *The Character Concept in Evolutionary Biology* (pp. 109-140). San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Houwenhuyse, S., Stoks, R., Mukherjee, S., i Decaestecker, E. (2021). Locally adapted gut microbiomes mediate host stress tolerance. *The ISME Journal*, 15(8), 2401-2414. doi:10.1038/s41396-021-00940-y

- Hsu, S.-K., Belmouaden, C., Nolte, V., i Schlötterer, C. (2021). Parallel gene expression evolution in natural and laboratory evolved populations. *Molecular Ecology*, 30(4), 884-894. doi:10.1111/mec.15649
- Huang, W., Carbone, M. A., Lyman, R. F., Anholt, R. R. H., i Mackay, T. F. C. (2020). Genotype by environment interaction for gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications*, 11(1), 5451. doi:10.1038/s41467-020-19131-y
- Huey, R., B., Gilchrist, G., W., Carlson, M., L., Berrigan, D., i Serra, L. s. (2000). Rapid Evolution of a Geographic Cline in Size in an Introduced Fly. *Science*, 287(5451), 308-309. doi:10.1126/science.287.5451.308
- Iatsenko, I., Boquete, J.-P., i Lemaitre, B. (2018). Microbiota-derived lactate activates production of reactive oxygen species by the intestinal NADPH oxidase Nox and shortens *Drosophila* lifespan. *Immunity*, 49(5), 929-942.e925. doi:10.1016/j.immuni.2018.09.017
- Immonen, E., Hoikkala, A., Kazem, A. J. N., i Ritchie, M. G. (2009). When are vomiting males attractive? Sexual selection on condition-dependent nuptial feeding in *Drosophila subobscura*. *Behavioral Ecology*, 20(2), 289-295. doi:10.1093/beheco/arp008
- Inamine, H., Ellner, S. P., Newell, P. D., Luo, Y., Buchon, N., i Douglas, A. E. (2018). Spatiotemporally Heterogeneous Population Dynamics of Gut Bacteria Inferred from Fecal Time Series Data. *MBio*, 9(1), e01453-01417. doi:10.1128/mBio.01453-17
- Isbell, F., Craven, D., Connolly, J., Loreau, M., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Bezemer, T. M., Bonin, C., Bruelheide, H., de Luca, E., Ebeling, A., Griffin, J. N., Guo, Q., Hautier, Y., Hector, A., Jentsch, A., Kreyling, J., Lanta, V., Manning, P., Meyer, S. T., Mori, A. S., Naeem, S., Niklaus, P. A., Polley, H. W., Reich, P. B., Roscher, C., Seabloom, E. W., Smith, M. D., Thakur, M. P., Tilman, D., Tracy, B. F., van der Putten, W. H., van Ruijven, J., Weigelt, A., Weisser, W. W., Wilsey, B., i Eisenhauer, N. (2015). Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes. *Nature*, 526(7574), 574-577. doi:10.1038/nature15374
- James, A. C., i Partridge, L. (1995). Thermal evolution of rate of larval development in *Drosophila melanogaster* in laboratory and field populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 8(3), 315-330. doi:10.1046/j.1420-9101.1995.8030315.x
- Janssens, T. K., Roelofs, D., i Van Straalen, N. M. (2009). Molecular mechanisms of heavy metal tolerance and evolution in invertebrates. *Insect science*, 16(1), 3-18. doi:10.1111/j.1744-7917.2009.00249.x
- Jaramillo, A., i Castañeda, L. E. (2021). Gut Microbiota of *Drosophila subobscura* Contributes to Its Heat Tolerance and Is Sensitive to Transient Thermal Stress. *Frontiers in microbiology*, 12, 654108. doi:10.3389/fmicb.2021.654108
- Jelić, M., Castro, J. A., Kurbalija Novičić, Z., Kenig, B., Dimitrijević, D., Savić Veselinović, M., Jovanović, M., Milovanović, D., Stamenković-Radak, M., i Andjelković, M. (2012). Absence of linkage disequilibria between chromosomal arrangements and mtDNA haplotypes in natural populations of *Drosophila subobscura* from the Balkan Peninsula. *Genome*, 55(3), 214-221. doi:10.1139/g2012-004
- Jenkins, N. L., Sgró, C. M., i Hoffmann, A. A. (2013). Environmental stress and the expression of genetic variation. In Bijlsma, R. & Loeschcke, V. (Eds.), *Environmental stress, adaptation and evolution* (Vol. 83). Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Jia, Y., Jin, S., Hu, K., Geng, L., Han, C., Kang, R., Pang, Y., Ling, E., Tan, E. K., i Pan, Y. (2021). Gut microbiome modulates *Drosophila* aggression through octopamine signaling. *Nature communications*, 12(1), 1-12. doi:10.1038/s41467-021-23041-y
- Jiang, X., Lin, D., Shao, H., i Yang, X. (2019). Antioxidant properties of *Komagataeibacter hansenii* CGMCC 3917 and its ameliorative effects on alcohol-induced liver injury in mice. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 355-364. doi:10.1080/19476337.2019.1584647

- Kalajdzic, P., Stamenkovic-Radak, M., i Andjelkovic, M. (2006). The effect of different concentrations of lead on inversion polymorphism in *Drosophilasubobscura*. *Hereditas*, *143*(2006), 41-46. doi:10.1111/j.2006.0018-0661.01939.x
- Kalajdzic, P., Kenig, B., i Andjelkovic, M. (2015). *Drosophila subobscura* flies adapted to low lead concentration carry no fitness cost. *Environmental Pollution*, *204*, 90-98. doi:10.1016/j.envpol.2015.04.022
- Kampfer, P., i Glaeser, S. (2013). Prokaryote Characterization and Identification. In Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (Eds.), *The prokaryotes* (pp. 123-147). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Kapun, M., Barrón, M. G., Staubach, F., Obbard, D. J., Wiberg, R. A. W., Vieira, J., Goubert, C., Rota-Stabelli, O., Kankare, M., Bogaerts-Márquez, M., Haudry, A., Waidele, L., Kozeretska, I., Pasyukova, E. G., Loeschcke, V., Pascual, M., Vieira, C. P., Serga, S., Montchamp-Moreau, C., Abbott, J., Gibert, P., Porcelli, D., Posnien, N., Sánchez-Gracia, A., Grath, S., Sucena, É., Bergland, A. O., Guerreiro, M. P. G., Onder, B. S., Argyridou, E., Guio, L., Schou, M. F., Deplancke, B., Vieira, C., Ritchie, M. G., Zwaan, B. J., Tauber, E., Orengo, D. J., Puerma, E., Aguadé, M., Schmidt, P., Parsch, J., Betancourt, A. J., Flatt, T., i González, J. (2020). Genomic Analysis of European *Drosophila melanogaster* Populations Reveals Longitudinal Structure, Continent-Wide Selection, and Previously Unknown DNA Viruses. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(9), 2661-2678. doi:10.1093/molbev/msaa120
- Kapun, M., Nunez, J. C. B., Bogaerts-Márquez, M., Murga-Moreno, J., Paris, M., Outten, J., Coronado-Zamora, M., Tern, C., Rota-Stabelli, O., Guerreiro, M. P. G., Casillas, S., Orengo, D. J., Puerma, E., Kankare, M., Ometto, L., Loeschcke, V., Onder, B. S., Abbott, J. K., Schaeffer, S. W., Rajpurohit, S., Behrman, E. L., Schou, M. F., Merritt, T. J. S., Lazzaro, B. P., Glaser-Schmitt, A., Argyridou, E., Staubach, F., Wang, Y., Tauber, E., Serga, S. V., Fabian, D. K., Dyer, K. A., Wheat, C. W., Parsch, J., Grath, S., Veselinovic, M. S., Stamenkovic-Radak, M., Jelic, M., Buendía-Ruiz, A. J., Gómez-Julián, M. J., Espinosa-Jimenez, M. L., Gallardo-Jiménez, F. D., Patenkovic, A., Eric, K., Tanaskovic, M., Ullastres, A., Guio, L., Merenciano, M., Guirao-Rico, S., Horváth, V., Obbard, D. J., Pasyukova, E., Alatortsev, V. E., Vieira, C. P., Vieira, J., Torres, J. R., Kozeretska, I., Maistrenko, O. M., Montchamp-Moreau, C., Mukha, D. V., Machado, H. E., Lamb, K., Paulo, T., Yusuf, L., Barbadilla, A., Petrov, D., Schmidt, P., Gonzalez, J., Flatt, T., i Bergland, A. O. (2021). *Drosophila* Evolution over Space and Time (DEST): A New Population Genomics Resource. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(12), 5782-5805. doi:10.1093/molbev/msab259
- Karasov, W. H., i Douglas, A. E. (2013). Comparative digestive physiology. *Comprehensive Physiology*, *3*(2), 741-783. doi:10.1002/cphy.c110054
- Kau, A. L., Ahern, P. P., Griffin, N. W., Goodman, A. L., i Gordon, J. I. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, *474*(7351), 327-336. doi:10.1038/nature10213
- Kawecki, T. J., i Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, *7*(12), 1225-1241. doi:10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x
- Kekic, V., Taylor, C., i Andjelkovic, M. (1980). Habitat choice and resource specialization by *Drosophila subobscura*. *Genetika*, *12*, 219-225.
- Keller, A. (2007). *Drosophila melanogaster*'s history as a human commensal. *Current Biology*, *17*(3), R77-R81. doi:10.1016/j.cub.2006.12.031
- Kenig, B., Stamenković-Radak, M., i Anđelković, M. (2013). Population specific fitness response of *Drosophila subobscura* to lead pollution. *Insect science*, *20*(2), 245-253. doi:10.1111/j.1744-7917.2012.01501.x

- Kenig, B., Kurbalija Novičić, Z., Patenković, A., Stamenković-Radak, M., i Anđelković, M. (2015). Adaptive Role of Inversion Polymorphism of *Drosophila subobscura* in Lead Stressed Environment. *PLoS one*, *10*(6), e0131270. doi:10.1371/journal.pone.0131270
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., i Smidt, H. (2018). Host and Environmental Factors Affecting the Intestinal Microbiota in Chickens. *Frontiers in microbiology*, *9*. doi:10.3389/fmicb.2018.00235
- Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., i Fukatsu, T. (2005). Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Applied and environmental microbiology*, *71*(7), 4035-4043. doi:10.1128/AEM.71.7.4035-4043.2005
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., i Fukatsu, T. (2011). Specific developmental window for establishment of an insect-microbe gut symbiosis. *Applied and environmental microbiology*, *77*(12), 4075-4081. doi:10.1128/AEM.00358-11
- Kim, Y., i Nielsen, R. (2004). Linkage disequilibrium as a signature of selective sweeps. *Genetics*, *167*(3), 1513-1524. doi:10.1534/genetics.103.025387
- Kimberly, D. A., i Salice, C. J. (2015). Evolutionary responses to climate change and contaminants: Evidence and experimental approaches. *Current Zoology*, *61*(4), 690-701. doi:10.1093/czoolo/61.4.690
- Kisand, V., Cuadros, R., i Wikner, J. (2002). Phylogeny of culturable estuarine bacteria catabolizing riverine organic matter in the northern Baltic Sea. *Applied and environmental microbiology*, *68*(1), 379-388. doi:10.1128/AEM.68.1.379-388.2002
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., i Glöckner, F. O. (2012). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), e1. doi:10.1093/nar/gks808
- Kohl, K. D., Weiss, R. B., Cox, J., Dale, C., i Denise Dearing, M. (2014). Gut microbes of mammalian herbivores facilitate intake of plant toxins. *Ecology Letters*, *17*(10), 1238-1246. doi:10.1111/ele.12329
- Koskinioti, P., Ras, E., Augustinos, A. A., Tsiamis, G., Beukeboom, L. W., Caceres, C., i Bourtzis, K. (2019). The effects of geographic origin and antibiotic treatment on the gut symbiotic communities of *Bactrocera oleae* populations. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *167*(3), 197-208. doi:10.1111/eea.12764
- Kriesner, P., Conner, W. R., Weeks, A. R., Turelli, M., i Hoffmann, A. A. (2016). Persistence of a *Wolbachia* infection frequency cline in *Drosophila melanogaster* and the possible role of reproductive dormancy. *Evolution*, *70*(5), 979-997. doi:10.1111/evo.12923
- Lachaise, D., Cariou, M.-L., David, J. R., Lemeunier, F., Tsacas, L., i Ashburner, M. (1988). Historical Biogeography of the *Drosophila melanogaster* Species Subgroup. In Hecht, M. K., Wallace, B., & Prance, G. T. (Eds.), *Evolutionary Biology* (pp. 159-225). Boston, MA, USA: Springer.
- Lai, K.-P., Chung, Y.-T., Li, R., Wan, H.-T., i Wong, C. K.-C. (2016). Bisphenol A alters gut microbiome: comparative metagenomics analysis. *Environmental Pollution*, *218*, 923-930. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.039
- Lalevic, B., Raicevic, V., Kikovic, D., Jovanovic, L., Surlan-Momirovic, G., Jovic, J., Talaie, A. R., i Morina, F. (2012). Biodegradation of MTBE by Bacteria Isolated from oil Hydrocarbons- Contaminated Environments. *International Journal of Environmental Research*, *6*(1), 81-86. doi:10.22059/ijer.2011.474
- Lavasani, P. S., Motevaseli, E., Sanikhani, N. S., i Modarressi, M. H. (2019). *Komagataeibacter xylinus* as a novel probiotic candidate with high glucose conversion rate properties. *Heliyon*, *5*(4), e01571-e01571. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01571

- Lee, H.-Y., Lee, S.-H., Lee, J.-H., Lee, W.-J., i Min, K.-J. (2019). The role of commensal microbes in the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Aging*, 11(13), 4611-4640. doi:10.18632/aging.102073
- Lee, Y. K., i Mazmanian, S. K. (2010). Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *science*, 330(6012), 1768-1773. doi:10.1126/science.1195568
- Leitão-Gonçalves, R., Carvalho-Santos, Z., Francisco, A. P., Fioreze, G. T., Anjos, M., Baltazar, C., Elias, A. P., Itskov, P. M., Piper, M. D., i Ribeiro, C. (2017). Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLoS biology*, 15(4), e2000862. doi:10.1371/journal.pbio.2000862
- Lemaitre, B., i Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 25, 697-743. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., i Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022-1023. doi:10.1038/4441022a
- Lindow, S. E., i Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 1875-1883. doi:10.1128/AEM.69.4.1875-1883.2003
- Liu, H., Guo, X., Gooneratne, R., Lai, R., Zeng, C., Zhan, F., i Wang, W. (2016). The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels. *Scientific reports*, 6, 24340-24340. doi:10.1038/srep24340
- Lizé, A., McKay, R., i Lewis, Z. (2014). Kin recognition in *Drosophila*: the importance of ecology and gut microbiota. *The ISME Journal*, 8(2), 469-477. doi:10.1038/ismej.2013.157
- Loeschcke, V., Krebs, R. A., Dahlggaard, J., i Michalak, P. (1997). High-temperature stress and the evolution of thermal resistance in *Drosophila*. In Bijlsma, R. & Loeschcke, V. (Eds.), *Environmental stress, adaptation and evolution* (Vol. 83). Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag.
- Long, A., Liti, G., Luptak, A., i Tenailon, O. (2015). Elucidating the molecular architecture of adaptation via evolve and resequence experiments. *Nature reviews. Genetics*, 16(10), 567-582. doi:10.1038/nrg3937
- Lozupone, C., i Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8228-8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., i Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220-230. doi:10.1038/nature11550
- Ma, M., Tu, C., Luo, J., Lu, M., Zhang, S., i Xu, L. (2021). Metabolic and immunological effects of gut microbiota in leaf beetles at the local and systemic levels. *Integrative Zoology*, 16(3), 313-323. doi:10.1111/1749-4877.12528
- Maher, R. L., Rice, M. M., McMinds, R., Burkepile, D. E., i Vega Thurber, R. (2019). Multiple stressors interact primarily through antagonism to drive changes in the coral microbiome. *Scientific reports*, 9(1), 6834. doi:10.1038/s41598-019-43274-8
- Malacrinò, A. (2022). Host species identity shapes the diversity and structure of insect microbiota. *Molecular Ecology*, 31(3), 723-735. doi:10.1111/mec.16285
- Mamlouk, D., i Gullo, M. (2013). Acetic Acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian journal of microbiology*, 53(4), 377-384. doi:10.1007/s12088-013-0414-z
- Mansourian, S., Corcoran, J., Enjin, A., Löfstedt, C., Dacke, M., i Stensmyr, Marcus C. (2016). Fecal-Derived Phenol Induces Egg-Laying Aversion in *Drosophila*. *Current Biology*, 26(20), 2762-2769. doi:10.1016/j.cub.2016.07.065
- Maraci, Ö., Antonatou-Papaioannou, A., Jünemann, S., Castillo-Gutiérrez, O., Busche, T., Kalinowski, J., i Caspers, B. A. (2021). The Gut Microbial Composition Is Species-

- Specific and Individual-Specific in Two Species of Estrildid Finches, the Bengalese Finch and the Zebra Finch. *Frontiers in microbiology*, 12. doi:10.3389/fmicb.2021.619141
- Marchesi, J. R., i Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 31. doi:10.1186/s40168-015-0094-5
- Margulis, L. (1990). Words as battle cries: symbiogenesis and the new field of endocytobiology. *Bioscience*, 40(9), 673-677. doi:10.2307/1311435
- Marinković, D., i Andjelković, M. (1972). Reproductive ability of *Drosophila subobscura* at different light intensities. *Dros. Inform. Serv.*, 48, 44.
- Martinez, D., Moya, A., Latorre, A., i Fereres, A. (1992). Mitochondrial Dna Variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) Populations from four Spanish Localities. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(2), 241-246. doi:10.1093/aesa/85.2.241
- Martinson, V. G., Danforth, B. N., Minckley, R. L., Rueppell, O., Tingek, S., i Moran, N. A. (2011). A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Molecular Ecology*, 20(3), 619-628. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04959.x
- Martinson, V. G., Moy, J., i Moran, N. A. (2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. *Applied and environmental microbiology*, 78(8), 2830-2840. doi:10.1128/AEM.07810-11
- Masindi, V., i Muedi, K. L. (2018). Environmental contamination by heavy metals. In Saleh, H. E.-D. M. & Aglan, R. F. (Eds.), *Heavy metals* (pp. 115-132): IntechOpen.
- Mateos, M., Castrezana, S. J., Nankivell, B. J., Estes, A. M., Markow, T. A., i Moran, N. A. (2006). Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *Genetics*, 174(1), 363-376. doi:10.1534/genetics.106.058818
- Matzkin, L. M., Johnson, S., Paight, C., Bozinovic, G., i Markow, T. A. (2011). Dietary protein and sugar differentially affect development and metabolic pools in ecologically diverse *Drosophila*. *The Journal of nutrition*, 141(6), 1127-1133. doi:10.3945/jn.111.138438
- Mazmanian, S. K., Round, J. L., i Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 453(7195), 620-625. doi:10.1038/nature07008
- McCutcheon, J. P., i Moran, N. A. (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 13-26. doi:10.1038/nrmicro2670
- McFall-Ngai, M., Hadfield Michael, G., Bosch Thomas, C. G., Carey Hannah, V., Domazet-Lošo, T., Douglas Angela, E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert Scott, F., Hentschel, U., King, N., Kjelleberg, S., Knoll Andrew, H., Kremer, N., Mazmanian Sarkis, K., Metcalf Jessica, L., Neelson, K., Pierce Naomi, E., Rawls John, F., Reid, A., Ruby Edward, G., Rumpho, M., Sanders Jon, G., Tautz, D., i Wernegreen Jennifer, J. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(9), 3229-3236. doi:10.1073/pnas.1218525110
- McMurdie, P. J., i Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PloS one*, 8(4), e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217
- Mead, L. J., Khachatourians, G., i Jones, G. (1988). Microbial ecology of the gut in laboratory stocks of the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Fab.)(Orthoptera: Acrididae). *Applied and environmental microbiology*, 54(5), 1174-1181. doi:10.1128/aem.54.5.1174-1181.1988
- Meindl, G. A., i Ashman, T.-L. (2013). The effects of aluminum and nickel in nectar on the foraging behavior of bumblebees. *Environmental Pollution*, 177, 78-81. doi:10.1016/j.envpol.2013.02.017

- Migula, P., Przybyłowicz, W., Nakonieczny, M., Augustyniak, M., Tarnawska, M., i Mesjasz-Przybyłowicz, J. (2011). Micro-PIXE studies of Ni-elimination strategies in representatives of two families of beetles feeding on Ni-hyperaccumulating plant *Berkheya coddii*. *X-Ray Spectrometry*, 40(3), 194-197. doi:10.1002/xrs.1310
- Mindell, D. P. (1992). Phylogenetic consequences of symbioses: Eukarya and Eubacteria are not monophyletic taxa. *Biosystems*, 27(1), 53-62. doi:10.1016/0303-2647(92)90046-2
- Mitrovski, P., i Hoffmann, A. A. (2001). Postponed reproduction as an adaptation to winter conditions in *Drosophila melanogaster*: evidence for clinal variation under semi-natural conditions. *Proceedings. Biological sciences*, 268(1481), 2163-2168. doi:10.1098/rspb.2001.1787
- Modak, S. G., Satish, K., Mohan, J., Dey, S., Raghavendra, N., Shakarad, M., i Joshi, A. (2009). A possible tradeoff between developmental rate and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of genetics*, 88(2), 253-256. doi:10.1007/s12041-009-0036-8
- Moghadam, N. N., Thorshauge, P. M., Kristensen, T. N., de Jonge, N., Bahrndorff, S., Kjeldal, H., i Nielsen, J. L. (2018). Strong responses of *Drosophila melanogaster* microbiota to developmental temperature. *Fly*, 12(1), 1-12. doi:10.1080/19336934.2017.1394558
- Monchanin, C., Devaud, J.-M., Barron, A. B., i Lihoreau, M. (2021). Current permissible levels of metal pollutants harm terrestrial invertebrates. *Science of The Total Environment*, 779, 146398. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146398
- Moreno, J., i Peinado, R. (2012). *Enological chemistry*. San Diego, USA: Academic Press.
- Murali, A., Bhargava, A., i Wright, E. S. (2018). IDTAXA: a novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*, 6(1), 140. doi:10.1186/s40168-018-0521-5
- Naeem, S., Thompson, L. J., Lawler, S. P., Lawton, J. H., i Woodfin, R. M. (1994). Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. *Nature*, 368(6473), 734-737. doi:10.1038/368734a0
- Nayak, S. K. (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41(11), 1553-1573. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02546.x
- Neave, M. J., Rachmawati, R., Xun, L., Michell, C. T., Bourne, D. G., Apprill, A., i Voolstra, C. R. (2017). Differential specificity between closely related corals and abundant *Endozoicomonas* endosymbionts across global scales. *The ISME Journal*, 11(1), 186-200. doi:10.1038/ismej.2016.95
- Newell, P. D., Chaston, J. M., Wang, Y., Winans, N. J., Sannino, D. R., Wong, A. C. N., Dobson, A. J., Kagle, J., i Douglas, A. E. (2014). In vivo function and comparative genomic analyses of the *Drosophila* gut microbiota identify candidate symbiosis factors. *Frontiers in microbiology*, 5, 576-576. doi:10.3389/fmicb.2014.00576
- Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., i Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262-1267. doi:10.1126/science.1223813
- Nie, Z., Zheng, Y., Xie, S., Zhang, X., Song, J., Xia, M., i Wang, M. (2017). Unraveling the correlation between microbiota succession and metabolite changes in traditional Shanxi aged vinegar. *Scientific reports*, 7(1), 1-12. doi:10.1038/s41598-017-09850-6
- Nikolov, J., Forkapić, S., Hansman, J., Bikit, I., Vesković, M., Todorović, N., Mrđa, D., i Bikit, K. (2014). Natural radioactivity around former uranium mine, Gabrovica in Eastern Serbia. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 302(1), 477-482. doi:10.1007/s10967-014-3203-1
- Noret, N., Jovens, G., Escarré, J., Lefèbvre, C., Panichelli, S., i Meerts, P. (2007). Development of *Issoria lathonia* (Lepidoptera: Nymphalidae) on zinc-accumulating and nonaccumulating *Viola* species (Violaceae). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 26(3), 565-571. doi:10.1897/06-413r.1.

- Oberhardt, M. A., Zarecki, R., Gronow, S., Lang, E., Klenk, H.-P., Gophna, U., i Ruppin, E. (2015). Harnessing the landscape of microbial culture media to predict new organism–media pairings. *Nature communications*, 6(1), 1-14. doi:10.1038/ncomms9493
- Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C.-H., Ndjango, J.-B. N., Peeters, M., Hahn, B. H., i Hugenholtz, P. (2010). Evolutionary Relationships of Wild Hominids Recapitulated by Gut Microbial Communities. *PLoS biology*, 8(11), e1000546. doi:10.1371/journal.pbio.1000546
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., i Wagner, H. (2020). vegan: Community Ecology Package (Version R package version 2.5-7).
- Pais, I. S., Valente, R. S., Sporniak, M., i Teixeira, L. (2018). *Drosophila melanogaster* establishes a species-specific mutualistic interaction with stable gut-colonizing bacteria. *PLoS biology*, 16(7), e2005710. doi:10.1371/journal.pbio.2005710
- Pascoe, E. L., Hauffe, H. C., Marchesi, J. R., i Perkins, S. E. (2017). Network analysis of gut microbiota literature: an overview of the research landscape in non-human animal studies. *The ISME Journal*, 11(12), 2644-2651. doi:10.1038/ismej.2017.133
- Pavoine, S., Dufour, A.-B., i Chessel, D. (2004). From dissimilarities among species to dissimilarities among communities: a double principal coordinate analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 228(4), 523-537. doi:10.1016/j.jtbi.2004.02.014
- Pennings, P. S., i Hermisson, J. (2006). Soft sweeps II—molecular population genetics of adaptation from recurrent mutation or migration. *Molecular Biology and Evolution*, 23(5), 1076-1084. doi:10.1093/molbev/msj117
- Peterson, L. R., Trivett, V., Baker, A. J., Aguiar, C., i Pollard, A. J. (2003). Spread of metals through an invertebrate food chain as influenced by a plant that hyperaccumulates nickel. *Chemoecology*, 13(2), 103-108. doi:10.1007/s00049-003-0234-4
- Phillips, C. D., Phelan, G., Dowd, S. E., McDonough, M. M., Ferguson, A. W., Delton Hanson, J., Siles, L., Ordóñez-Garza, N., San Francisco, M., i Baker, R. J. (2012). Microbiome analysis among bats describes influences of host phylogeny, life history, physiology and geography. *Molecular Ecology*, 21(11), 2617-2627. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05568.x
- Piggott, J. J., Townsend, C. R., i Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecology and evolution*, 5(7), 1538-1547. doi:10.1002/ece3.1465
- Pool, J. E., Corbett-Detig, R. B., Sugino, R. P., Stevens, K. A., Cardeno, C. M., Crepeau, M. W., Duchon, P., Emerson, J. J., Saelao, P., Begun, D. J., i Langley, C. H. (2012). Population Genomics of sub-saharan *Drosophila melanogaster*: African diversity and non-African admixture. *PLOS Genetics*, 8(12), e1003080-e1003080. doi:10.1371/journal.pgen.1003080
- Prasad, N. G., Shakarad, M., Gohil, V. M., Sheeba, V., Rajamani, M., i Joshi, A. (2000). Evolution of reduced pre-adult viability and larval growth rate in laboratory populations of *Drosophila melanogaster* selected for shorter development time. *Genetical Research*, 76(3), 249-259. doi:10.1017/S0016672300004754
- Price, T. D., Qvarnström, A., i Irwin, D. E. (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1523), 1433-1440.
- Pritchard, J. K., Pickrell, J. K., i Coop, G. (2010). The genetics of human adaptation: hard sweeps, soft sweeps, and polygenic adaptation. *Current Biology*, 20(4), R208-R215. doi:10.1016/j.cub.2009.11.055
- Przeworski, M. (2002). The signature of positive selection at randomly chosen loci. *Genetics*, 160(3), 1179-1189. doi:10.1093/genetics/160.3.1179

- Qanbari, S., Strom, T. M., Haberer, G., Weigend, S., Gheyas, A. A., Turner, F., Burt, D. W., Preisinger, R., Gianola, D., i Simianer, H. (2012). A high resolution genome-wide scan for significant selective sweeps: an application to pooled sequence data in laying chickens. *PLOS ONE*, 7(11), e49525. doi:10.1371/journal.pone.0049525
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., i Yamada, T. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65. doi:10.1038/nature08821
- Ramalho, M. O., Bueno, O. C., i Moreau, C. S. (2017). Species-specific signatures of the microbiome from *Camponotus* and *Colobopsis* ants across developmental stages. *PLOS ONE*, 12(11), e0187461. doi:10.1371/journal.pone.0187461
- RCoreTeam. (2021). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Relman, D. A. (2012). The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutrition reviews*, 70, S2-S9. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x
- Ren, C., Webster, P., Finkel, S. E., i Tower, J. (2007). Increased internal and external bacterial load during *Drosophila* aging without life-span trade-off. *Cell metabolism*, 6(2), 144-152. doi:10.1016/j.cmet.2007.06.006
- Ricci, I., Valzano, M., Ulissi, U., Epis, S., Cappelli, A., i Favia, G. (2012). Symbiotic control of mosquito borne disease. *Pathogens and Global Health*, 106(7), 380-385. doi:10.1179/2047773212Y.0000000051
- Rieger, D., Fraunholz, C., Popp, J., Bichler, D., Dittmann, R., i Helfrich-Förster, C. (2007). The fruit fly *Drosophila melanogaster* favors dim light and times its activity peaks to early dawn and late dusk. *Journal of biological rhythms*, 22(5), 387-399. doi:10.1177/0748730407306198
- Roane, T. M. (1999). Lead Resistance in Two Bacterial Isolates from Heavy Metal-Contaminated Soils. *Microbial Ecology*, 37(3), 218-224. doi:10.1007/s002489900145
- Roff, D. (1992). *Evolution of life histories: theory and analysis*. New York: Chapman & Hall.
- Roff, D. A., i Fairbairn, D. (2007). The evolution of trade-offs: where are we? *Journal of evolutionary biology*, 20(2), 433-447. doi:10.1111/j.1420-9101.2006.01255.x
- Rogell, B., Hofman, M., Eklund, M., Laurila, A., i Höglund, J. (2009). The interaction of multiple environmental stressors affects adaptation to a novel habitat in the natterjack toad *Bufo calamita*. *Journal of Evolutionary Biology*, 22(11), 2267-2277. doi:10.1111/j.1420-9101.2009.01842.x
- Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, F., i Knowlton, N. (2002). Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 243, 1-10. doi:10.3354/meps243001
- Rosen, M. J., Callahan, B. J., Fisher, D. S., i Holmes, S. P. (2012). Denoising PCR-amplified metagenome data. *BMC bioinformatics*, 13(1), 283. doi:10.1186/1471-2105-13-283
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., i Zilber-Rosenberg, I. (2007). The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355-362.
- Rosenberg, E., i Zilber-Rosenberg, I. (2014). *The hologenome concept: human, animal and plant microbiota*. Switzerland: Springer, Cham.
- Rosshart, S. P., Vassallo, B. G., Angeletti, D., Hutchinson, D. S., Morgan, A. P., Takeda, K., Hickman, H. D., McCulloch, J. A., Badger, J. H., Ajami, N. J., Trinchieri, G., Pardo-Manuel de Villena, F., Yewdell, J. W., i Rehmann, B. (2017). Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell*, 171(5), 1015-1028.e1013. doi:10.1016/j.cell.2017.09.016

- Rothenberg, S. E., Keiser, S., Ajami, N. J., Wong, M. C., Gesell, J., Petrosino, J. F., i Johs, A. (2016). The role of gut microbiota in fetal methylmercury exposure: Insights from a pilot study. *Toxicology Letters*, 242, 60-67. doi:10.1016/j.toxlet.2015.11.022
- Rowland, I. R., Robinson, R. D., i Doherty, R. A. (1984). Effects of Diet on Mercury Metabolism and Excretion in Mice Given Methylmercury: Role of Gut Flora. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 39(6), 401-408. doi:10.1080/00039896.1984.10545872
- Rudman, S. M., Greenblum, S., Hughes, R. C., Rajpurohit, S., Kiratli, O., Lowder, D. B., Lemmon, S. G., Petrov, D. A., Chaston, J. M., i Schmidt, P. (2019). Microbiome composition shapes rapid genomic adaptation of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(40), 20025-20032. doi:10.1073/pnas.1907787116
- Rutherford, S. L., i Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709), 336-342. doi:10.1038/24550
- Ryu, J.-H., Kim, S.-H., Lee, H.-Y., Bai, J. Y., Nam, Y.-D., Bae, J.-W., Lee, D. G., Shin, S. C., Ha, E.-M., i Lee, W.-J. (2008). Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *science*, 319(5864), 777-782.
- Ryu, J.-H., Ha, E.-M., i Lee, W.-J. (2010). Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(4), 369-376. doi:10.1016/j.dci.2009.11.010
- Salem, H., Bauer, E., Kirsch, R., Berasategui, A., Cripps, M., Weiss, B., Koga, R., Fukumori, K., Vogel, H., i Fukatsu, T. (2017). Drastic genome reduction in an herbivore's pectinolytic symbiont. *Cell*, 171(7), 1520-1531. e1513. doi:10.1016/j.cell.2017.10.029
- Santo Domingo, J., Kaufman, M., Klug, M., Holben, W., Harris, D., i Tiedje, J. (1998). Influence of diet on the structure and function of the bacterial hindgut community of crickets. *Molecular Ecology*, 7(6), 761-767. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00390.x
- Scheiner, S. M. (2016). Habitat choice and temporal variation alter the balance between adaptation by genetic differentiation, a jack-of-all-trades strategy, and phenotypic plasticity. *The American Naturalist*, 187(5), 633-646. doi:10.1086/685812
- Schliep, K. P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, 27(4), 592-593. doi:10.1093/bioinformatics/btq706
- Schlötterer, C., Kofler, R., Versace, E., Tobler, R., i Franssen, S. U. (2015). Combining experimental evolution with next-generation sequencing: a powerful tool to study adaptation from standing genetic variation. *Heredity*, 114(5), 431-440. doi:10.1038/hdy.2014.86
- Schmidt, P. S., Matzkin, L., Ippolito, M., i Eanes, W. F. (2005). Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 59(8), 1721-1732. doi:10.1111/j.0014-3820.2005.tb01821.x
- Schoville, S. D., Barreto, F. S., Moy, G. W., Wolff, A., i Burton, R. S. (2012). Investigating the molecular basis of local adaptation to thermal stress: population differences in gene expression across the transcriptome of the copepod *Tigriopus californicus*. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 170. doi:10.1186/1471-2148-12-170
- Schulte, P. M. (2007). Responses to environmental stressors in an estuarine fish: Interacting stressors and the impacts of local adaptation. *Journal of Thermal Biology*, 32(3), 152-161. doi:10.1016/j.jtherbio.2007.01.012
- Scudder, G. G. E. (2017). The Importance of Insects. In *Insect Biodiversity* (pp. 9-43).
- Sender, R., Fuchs, S., i Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, 14(8), e1002533-e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533

- Sepulveda, J., i Moeller, A. H. (2020). The Effects of Temperature on Animal Gut Microbiomes. *Frontiers in microbiology*, 11, 384-384. doi:10.3389/fmicb.2020.00384
- Shade, A. (2017). Diversity is the question, not the answer. *The ISME Journal*, 11(1), 1-6. doi:10.1038/ismej.2016.118
- Shahandeh, M. P., Brock, C., i Turner, T. L. (2020). Light dependent courtship behavior in *Drosophila simulans* and *D. melanogaster*. *PeerJ*, 8, e9499-e9499. doi:10.7717/peerj.9499
- Sharon, G., Segal, D., Zilber-Rosenberg, I., i Rosenberg, E. (2011). Symbiotic bacteria are responsible for diet-induced mating preference in *Drosophila melanogaster*, providing support for the hologenome concept of evolution. *Gut Microbes*, 2(3), 190-192. doi:10.4161/gmic.2.3.16103
- Sheh, A., i Fox, J. G. (2013). The role of the gastrointestinal microbiome in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Gut Microbes*, 4(6), 505-531. doi:10.4161/gmic.26205
- Shin, S. C., Kim, S.-H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K.-A., Yoon, J.-H., Ryu, J.-H., i Lee, W.-J. (2011). *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 334(6056), 670-674. doi:10.1126/science.1212782
- Siddiqui, R., Cruz Soares, N., i Khan, N. A. (2021). Crocodile Gut Microbiome Is a Potential Source of Novel Bioactive Molecules. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 4(3), 1260-1261. doi:10.1021/acscptsci.1c00108
- Silva, V., Palacios-Muñoz, A., Okray, Z., Adair, K. L., Waddell, S., Douglas, A. E., i Ewer, J. (2021). The impact of the gut microbiome on memory and sleep in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 224(3), jeb233619.
- Simhadri, R. K., Fast, E. M., Guo, R., Schultz, M. J., Vaisman, N., Ortiz, L., Bybee, J., Slatko, B. E., i Frydman, H. M. (2017). The Gut Commensal Microbiome of *Drosophila melanogaster* Is Modified by the Endosymbiont *Wolbachia*. *mSphere*, 2(5), e00287-00217. doi:10.1128/mSphere.00287-17
- Sivakoff, F., i Gardiner, M. (2017). Soil lead contamination decreases bee visit duration at sunflowers. *Urban Ecosystems*, 20, 1-8. doi:10.1007/s11252-017-0674-1
- Smith, J. M., i Haigh, J. (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*, 23(1), 23-35. doi:10.1017/S0016672300014634
- Spor, A., Koren, O., i Ley, R. (2011). Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4), 279-290. doi:10.1038/nrmicro2540
- Stamenkovic-Radak, M., Kalajdzic, P., Savic, T., Savic, M., Kurbalija, Z., Rasic, G., i Andjelkovic, M. (2008a). The effect of lead on fitness components and developmental stability in *Drosophila subobscura*. *Acta Biologica Hungarica*, 59(1), 47-56. doi:10.1556/ABiol.59.2008.1.4
- Stamenkovic-Radak, M., Rasic, G., Savic, T., Kalajdzic, P., Kurbalija, Z., Kenig, B., i Andjelkovic, M. (2008b). Monitoring of the genetic structure of natural populations: change of the effective population size and inversion polymorphism in *Drosophila subobscura*. *Genetica*, 133(1), 57-63. doi:10.1007/s10709-007-9183-0
- Stamenković-Radak, M. (2015). Evolucija se odigrava: svedočenja i dokazi u realnom vremenu sa *Drosophila subobscura*. In *RAZNOVRSNOST u nastanku i trajanju: zbirka naučnih radova*. Beograd, Srbija: Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet.
- Stanković, S. (1962). *Ekologija životinja*. Srbija, Beograd: Zavod za izdavanje udžbenika socijalističke republike Srbije.
- StatSoftInc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. Tulsa, OK, USA.
- Staubach, F., Baines, J. F., Künzel, S., Bik, E. M., i Petrov, D. A. (2013). Host species and environmental effects on bacterial communities associated with *Drosophila* in the

- laboratory and in the natural environment. *PloS one*, 8(8), e70749. doi:10.1371/journal.pone.0070749
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. Oxford, London, UK: Oxford University Press.
- Stecher, B., i Hardt, W.-D. (2011). Mechanisms controlling pathogen colonization of the gut. *Current Opinion in Microbiology*, 14(1), 82-91. doi:10.1016/j.mib.2010.10.003
- Stegen, J. C., Bottos, E. M., i Jansson, J. K. (2018). A unified conceptual framework for prediction and control of microbiomes. *Current Opinion in Microbiology*, 44, 20-27. doi:10.1016/j.mib.2018.06.002
- Storelli, G., Defaye, A., Erkosar, B., Hols, P., Royet, J., i Leulier, F. (2011). Lactobacillus plantarum promotes Drosophila systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell metabolism*, 14(3), 403-414. doi:10.1016/j.cmet.2011.07.012
- Sturtevant, A. H. (1917). Genetic factors affecting the strength of linkage in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 3(9), 555. doi:10.1073/pnas.3.9.555
- Su, C., Lei, L., Duan, Y., Zhang, K.-Q., i Yang, J. (2012). Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 993-1003. doi:10.1007/s00253-011-3800-7
- Sun, H.-X., Dang, Z., Xia, Q., Tang, W.-C., i Zhang, G.-R. (2011). The effect of dietary nickel on the immune responses of Spodoptera litura Fabricius larvae. *Journal of Insect Physiology*, 57(7), 954-961. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.04.008
- Suzuki, T. A., Martins, F. M., i Nachman, M. W. (2019). Altitudinal variation of the gut microbiota in wild house mice. *Molecular ecology*, 28(9), 2378-2390. doi:10.1111/mec.14905
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G., i Zuberer, D. A. (2005). *Principles and applications of soil microbiology*. Upper Saddle River, New Jersey, USA: Prentice Hall.
- Talwar, C., Nagar, S., Lal, R., i Negi, R. K. (2018). Fish Gut Microbiome: Current Approaches and Future Perspectives. *Indian journal of microbiology*, 58(4), 397-414. doi:10.1007/s12088-018-0760-y
- Tanasković, M., Novičić, Z. K., Kenig, B., Stamenković-Radak, M., i Andjelković, M. (2015). Effect of lead pollution on fitness and its dependence on heterozygosity in Drosophila subobscura. *Journal of genetics*, 94(4), 643-649. doi:10.1007/s12041-015-0569-y
- Tanasković, M., Kurbalija Novičić, Z., Kenig, B., Veselinović Savić, M., Stamenković-Radak, M., i Anđelković, M. (2016). Synergistic effect of environmental and genomic stress on wing size of drosophila subobscura. *Genetika*, 48(3), 1039-1052. doi:10.2298/GENSR1603039T
- Téfit, M. A., i Leulier, F. (2017). Lactobacillus plantarum favors the early emergence of fit and fertile adult Drosophila upon chronic undernutrition. *Journal of Experimental Biology*, 220(5), 900-907. doi:10.1242/jeb.151522
- Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A., Gibbons, S. M., Ackermann, G., Navas-Molina, J. A., Janssen, S., Kopylova, E., Vázquez-Baeza, Y., González, A., Morton, J. T., Mirarab, S., Zech Xu, Z., Jiang, L., Haroon, M. F., Kanbar, J., Zhu, Q., Jin Song, S., Kosciolk, T., Bokulich, N. A., Lefler, J., Brislawn, C. J., Humphrey, G., Owens, S. M., Hampton-Marcell, J., Berg-Lyons, D., McKenzie, V., Fierer, N., Fuhrman, J. A., Clauset, A., Stevens, R. L., Shade, A., Pollard, K. S., Goodwin, K. D., Jansson, J. K., Gilbert, J. A., Knight, R., i Earth Microbiome Project, C. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, 551(7681), 457-463. doi:10.1038/nature24621

- Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., i Affourtit, J. P. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484. doi:10.1038/nature07540
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., i Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(4), 327-338. doi:10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x
- Unckless, R. L., Rottschaefer, S. M., i Lazzaro, B. P. (2015). The Complex Contributions of Genetics and Nutrition to Immunity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS genetics*, 11(3), e1005030. doi:10.1371/journal.pgen.1005030
- Vanhoutte, T., Huys, G., De Brandt, E., i Swings, J. (2004). Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. *FEMS microbiology ecology*, 48(3), 437-446. doi:10.1016/j.femsec.2004.03.001
- Videvall, E., Song, S. J., Bensch, H. M., Strandh, M., Engelbrecht, A., Serfontein, N., Hellgren, O., Olivier, A., Cloete, S., Knight, R., i Cornwallis, C. K. (2020). Early-life gut dysbiosis linked to juvenile mortality in ostriches. *Microbiome*, 8(1), 147-147. doi:10.1186/s40168-020-00925-7
- Visôto, L., Oliveira, M., Guedes, R., Ribon, A., i Good-God, P. (2009). Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Journal of Insect Physiology*, 55(3), 185-191. doi:10.1016/j.jinsphys.2008.10.017
- Waddington, C. H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150(3811), 563-565. doi:10.1038/150563a0
- Waddington, C. H. (1953). Genetic assimilation of an acquired character. *Evolution*, 118-126. doi:10.1111/j.1558-5646.1953.tb00070.x
- Walker, C. H., Sibly, R., Hopkin, S. P., i Peakall, D. B. (2012). *Principles of ecotoxicology*. Boca Raton, FL, USA: CRC press.
- Wang, L., Zhou, C., He, Z., Wang, Z.-G., Wang, J.-L., i Wang, Y.-F. (2012). Wolbachia infection decreased the resistance of *Drosophila* to lead. *PLOS ONE*, 7(3), e32643. doi:10.1371/journal.pone.0032643
- Wang, Y., Kapun, M., Waidele, L., Kuenzel, S., Bergland, A., i Staubach, F. (2019). Continent-wide structure of bacterial microbiomes of European *Drosophila melanogaster* suggests host-control. *bioRxiv*, 527531. doi:10.1101/527531
- Welch, J. L. M., Hasegawa, Y., McNulty, N. P., Gordon, J. I., i Borisy, G. G. (2017). Spatial organization of a model 15-member human gut microbiota established in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(43), E9105-E9114. doi:10.1073/pnas.1711596114
- Werren, J. H., i Windsor, D. M. (2000). Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1450), 1277-1285. doi:10.1098/rspb.2000.1139
- Whipps, J., Lewis, K., i Cooke, R. (1988). Mycoparasitism and plant disease control. In Burge, N. M. (Ed.), *Fungi in biological control systems* (pp. 161-187). Manchester, UK: Manchester University Press.
- Wong, A. C.-N., Dobson, A. J., i Douglas, A. E. (2014). Gut microbiota dictates the metabolic response of *Drosophila* to diet. *Journal of Experimental Biology*, 217(11), 1894-1901. doi:10.1242/jeb.101725
- Wong, A. C. N., Chaston, J. M., i Douglas, A. E. (2013). The inconstant gut microbiota of *Drosophila* species revealed by 16S rRNA gene analysis. *The ISME Journal*, 7(10), 1922-1932. doi:10.1038/ismej.2013.86

- Wong, C. N. A., Ng, P., i Douglas, A. E. (2011). Low-diversity bacterial community in the gut of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *Environmental Microbiology*, *13*(7), 1889-1900. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02511.x
- Wright, E. S. (2015). DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, *16*(1), 322. doi:10.1186/s12859-015-0749-z
- Wu, F., Ha, Y., Weiss, A., Wang, M., Letourneau, J., Wang, S., Luo, N., Huang, S., Lee, C. T., David, L. A., i You, L. (2022). Modulation of microbial community dynamics by spatial partitioning. *Nature Chemical Biology*, *18*, 394-402. doi:10.1038/s41589-021-00961-w
- Wu, J., Wen, X. W., Faulk, C., Boehnke, K., Zhang, H., Dolinoy, D. C., i Xi, C. (2016). Perinatal lead exposure alters gut microbiota composition and results in sex-specific bodyweight increases in adult mice. *Toxicological Sciences*, *151*(2), 324-333. doi:10.1093/toxsci/kfw046
- Xia, J., Lu, L., Jin, C., Wang, S., Zhou, J., Ni, Y., Fu, Z., i Jin, Y. (2018a). Effects of short term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *209*, 1-8. doi:10.1016/j.cbpc.2018.03.007
- Xia, X., Sun, B., Gurr, G. M., Vasseur, L., Xue, M., i You, M. (2018b). Gut microbiota mediate insecticide resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Frontiers in microbiology*, *9*, 25. doi: 10.3389/fmicb.2018.00025
- Yachi, S., i Loreau, M. (1999). Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*(4), 1463-1468. doi:10.1073/pnas.96.4.1463
- Yashiro, E., Spear, R. N., i McManus, P. S. (2011). Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *Journal of Applied Microbiology*, *110*(5), 1284-1296. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.04975.x
- Ye, Y. H., Seleznev, A., Flores, H. A., Woolfit, M., i McGraw, E. A. (2017). Gut microbiota in *Drosophila melanogaster* interacts with *Wolbachia* but does not contribute to *Wolbachia*-mediated antiviral protection. *Journal of Invertebrate Pathology*, *143*, 18-25. doi:10.1016/j.jip.2016.11.011
- Youssef, N. H., Couger, M., McCully, A. L., Criado, A. E. G., i Elshahed, M. S. (2015). Assessing the global phylum level diversity within the bacterial domain: a review. *Journal of advanced research*, *6*(3), 269-282. doi:10.1016/j.jare.2014.10.005
- Zhou, S., Luoma, S. E., St. Armour, G. E., Thakkar, E., Mackay, T. F., i Anholt, R. R. (2017). A *Drosophila* model for toxicogenomics: genetic variation in susceptibility to heavy metal exposure. *PLoS genetics*, *13*(7), e1006907. doi:10.1371/journal.pgen.1006907
- Zilber-Rosenberg, I., i Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS microbiology reviews*, *32*(5), 723-735. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x
- Zwaan, B. J., Azevedo, R. B. R., James, A. C., van 't Land, J., i Partridge, L. (2000). Cellular basis of wing size variation in *Drosophila melanogaster*: a comparison of latitudinal clines on two continents. *Heredity*, *84*(3), 338-347. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00677.x

8. Prilozi

Prilog 1. Relativna procentualna zastupljenost bakterijskih zajednica u okviru mikrobiote u svim uzorcima Priroda/lab eksperimenta. Uključeni su samo oni taksoni koji su bili zastupljeni sa >2% po uzorku.

	Dmel_Wild	Dmel_Lab	Dsub_Wild	Dsub_Lab
Filum				
Proteobacteria	71,86	77,76	49,18	17,84
Firmicutes	23,35	11,62	23,77	50,03
Actinobacteria	0,46	0,94	3,14	12,57
Bacteroidetes	3,07	5,04	18,49	12,36
Porodica				
Anaplasmataceae	11,16	48,11	0,05	0
Acetobacteraceae	14,07	26,40	41,12	8,01
Leuconostocaceae	19,58	5,48	6,22	11,01
Enterobacteriaceae	38,23	0,09	1,95	0,48
Lactobacillaceae	0,08	0,44	3,11	26,65
Propionibacteriaceae	0,05	0,16	0,55	9,80
Wohlfahrtiimonadaceae	7,36	0	0	0
Weeksellaceae	0,28	0,05	6,31	0
Staphylococcaceae	0,01	0	0,66	1,90
Enterococcaceae	1,94	0	0,41	0
Prevotellaceae	0,73	1,42	4,89	3,39
Bacteroidaceae	0,47	1,19	1,29	2,21
Ruminococcaceae	0,82	1,94	4,18	4,11
Rikenellaceae	0,62	1,04	2,55	1,86
Lachnospiraceae	0,36	1,68	2,78	3,07
Rod				
<i>Wolbachia</i>	11,16	48,11	0,05	0
<i>Gluconobacter</i>	0,97	0,23	40,96	8,01
<i>Acetobacter</i>	13,04	26,17	0,02	0
<i>Leuconostoc</i>	2,24	5,48	6,22	11,01
<i>Providencia</i>	30,37	0	0,05	0,03
<i>Lactobacillus</i>	0,08	0,39	3,11	26,65
<i>Fructobacillus</i>	17,27	0	0	0
<i>Cutibacterium</i>	0,05	0,16	0,55	9,80
<i>Wohlfahrtiimonas</i>	7,36	0	0	0
<i>Chishuiella</i>	0,28	0	6,31	0
<i>Staphylococcus</i>	0,01	0	0,66	1,90
<i>Pantoea</i>	2,05	0	0,10	0
NA (porodica Enterobacteriaceae)	2,96	0	0,03	0,02
<i>Bacteroides</i>	0,47	1,19	1,29	2,21
<i>Prevotella_1</i>	0,29	0,50	3,32	0,89
Rikenellaceae_RC9_gut_group	0,32	0,71	2,12	1,14

Prilog 2. Relativna procentualna zastupljenost (a) filuma, (b) porodica i (c) rodova u okviru mikrobiote u roditeljskim uzorcima Standard/olovo F13 eksperimenta. Uključeni su samo oni taksoni koji su bili zastupljeni sa >2% po uzorku.

(a)	Filum	
	Proteobacteria	Firmicutes
Dmel_St_M	99,69	0,3
Dmel_St_F	98,29	1,7
Dsub_St_M	99,99	0
Dsub_St_F	99,97	0,01
Dmel_C3_M	97,02	2,98
Dmel_C3_F	89,9	10,1
Dsub_C3_M	80,76	19,24
Dsub_C3_F	97,4	2,6

(b)	Porodica		
	Acetobacteraceae	Anaplasmataceae	Lactobacillaceae
Dmel_St_M	7,17	92,48	0,29
Dmel_St_F	5,93	92,33	1,7
Dsub_St_M	99,59	0,04	0
Dsub_St_F	99,88	0,03	0
Dmel_C3_M	1,28	95,7	2,98
Dmel_C3_F	0,03	89,84	10,1
Dsub_C3_M	80,75	0	19,24
Dsub_C3_F	97,39	0	2,6

(c)	Rod			
	<i>Acetobacter</i>	<i>Wolbachia</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>
Dmel_St_M	7,17	92,48	0,29	0
Dmel_St_F	5,93	92,33	1,7	0
Dsub_St_M	99,59	0,04	0	0
Dsub_St_F	99,88	0,03	0	0
Dmel_C3_M	1,2855	95,7	1,6	1,38
Dmel_C3_F	0,03	89,84	0,53	9,57
Dsub_C3_M	80,75	0	19,24	0
Dsub_C3_F	97,39	0	2,6	0

Prilog 3. Relativna procentualna zastupljenost (a) filuma, (b) porodica i (c) rodova u okviru mikrobiote u potomačkim F13 uzorcima Standard/olovo F13 eksperimenta. Uključeni su samo oni taksoni koji su bili zastupljeni sa >2% po uzorku.

(a)	Filum	
	Proteobacteria	Firmicutes
Dmel_St_M	86,8	13,17
Dmel_St_F	96,68	3,31
Dsub_St_M	99,97	0
Dsub_St_F	99,97	0,01
Dmel_C3_M	99,86	0,12
Dmel_C3_F	99,85	0,15
Dsub_C3_M	99,84	0,11
Dsub_C3_F	99,94	0,05

(b)	Porodica		
	Acetobacteraceae	Anaplasmataceae	Leuconostocaceae
Dmel_St_M	8,91	77,89	13,15
Dmel_St_F	46,89	49,78	2,48
Dsub_St_M	99,87	0,07	0
Dsub_St_F	99,9	0,07	0
Dmel_C3_M	11,27	88,59	0,05
Dmel_C3_F	50,75	49,1	0,04
Dsub_C3_M	99,8	0	0
Dsub_C3_F	99,93	0	0

(c)	Rod			
	<i>Komagataeibacter</i>	<i>Wolbachia</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Leuconostoc</i>
Dmel_St_M	0,07	77,89	8,84	13,15
Dmel_St_F	4,43	49,78	42,45	2,48
Dsub_St_M	82,15	0,07	17,71	0
Dsub_St_F	82,8	0,07	17,09	0
Dmel_C3_M	10,05	88,59	1,22	0,05
Dmel_C3_F	37,46	49,1	13,28	0,04
Dsub_C3_M	96,55	0	3,25	0
Dsub_C3_F	98,03	0	1,9	0

Prilog 4. Relativna procentualna zastupljenost (a) filuma, (b) porodica i (c) rodova u okviru mikrobiote u svim uzorcima Standard/olovo F35 eksperimenta. Uključeni su samo oni taksoni koji su bili zastupljeni sa >2% po uzorku.

(a)	Filum	
	Proteobacteria	Firmicutes
Dmel_St_Sl_L	99,13	0,87
Dmel_Sl_St_M	95,36	4,59
Dsub_St_K_L	99,97	0,028
Dmel_Sl_St_F	62,27	37,73
Dsub_St_Sl_L	99,66	0,33
Dmel_K_C3_M	99,28	0,72
Dmel_C3_K_L	91,02	8,98
Dsub_K_St_F	100	0
Dmel_K_C3_F	90,17	9,83
Dmel_C3_Sl_L	99,91	0,09
Dsub_Sl_St_F	100	0
Dmel_Sl_C3_M	97,9	2,1
Dsub_K_C3_M	99,98	0,02
Dsub_C3_K_L	98,58	1,4
Dsub_K_C3_F	100	0
Dmel_Sl_C3_F	90,98	9,02
Dsub_Sl_C3_M	99,98	0,02
Dsub_C3_Sl_L	94,7	5,28
Dsub_Sl_C3_F	99,96	0,04
Dsub_K_St_M	100	0
Dmel_K_St_M	89,56	10,08
Dmel_K_St_F	45,61	54,38
Dmel_St_K_L	99,77	0,23
Dsub_Sl_St_M	99,97	0,03

(b)	Porodica		
	Anaplasmataceae	Acetobacteraceae	Lactobacillaceae
Dmel_St_Sl_L	19,48	79,64	0,87
Dmel_Sl_St_M	93,9	1,44	4,54
Dsub_St_K_L	0	99,93	0,03
Dmel_Sl_St_F	62,05	0,19	37,71
Dsub_St_Sl_L	0	99,6	0,33
Dmel_K_C3_M	97,43	1,83	0,72
Dmel_C3_K_L	66,17	24,85	8,98
Dsub_K_St_F	0	100	0
Dmel_K_C3_F	89,4	0,78	9,83
Dmel_C3_Sl_L	98,86	1,01	0,09
Dsub_Sl_St_F	0	100	0
Dmel_Sl_C3_M	85,97	11,93	2,1
Dsub_K_C3_M	0	99,98	0,02
Dsub_C3_K_L	0,11	98,26	1,36
Dsub_K_C3_F	0	100	0

Dmel_Sl_C3_F	46,98	44	9,02
Dsub_Sl_C3_M	0	99,98	0,02
Dsub_C3_Sl_L	0,02	94,53	5,28
Dsub_Sl_C3_F	0	99,96	0,04
Dsub_K_St_M	0	100	0
Dmel_K_St_M	88,36	1,03	10,03
Dmel_K_St_F	43,37	2,22	54,37
Dmel_St_K_L	21,33	78,43	0,23
Dsub_Sl_St_M	0	99,97	0,03

(c)	Rod			
	<i>Wolbachia</i>	<i>Komagataeibacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Lactobacillus</i>
Dmel_St_Sl_L	19,48	0,11	79,53	0,87
Dmel_Sl_St_M	93,9	1,17	0,26	4,54
Dsub_St_K_L	0	3,79	96,14	0,03
Dmel_Sl_St_F	62,05	0,03	0,16	37,71
Dsub_St_Sl_L	0	7,8	91,79	0,33
Dmel_K_C3_M	97,43	0,07	0	0,72
Dmel_C3_K_L	66,17	16,23	7,8	8,98
Dsub_K_St_F	0	0,94	99,06	0
Dmel_K_C3_F	89,4	0,22	0	9,83
Dmel_C3_Sl_L	98,86	0,09	0,86	0,09
Dsub_Sl_St_F	0	92,18	7,82	0
Dmel_Sl_C3_M	85,97	0,016	11,91	2,1
Dsub_K_C3_M	0	98,67	1,31	0,02
Dsub_C3_K_L	0,11	20,06	78,2	1,36
Dsub_K_C3_F	0	98,66	1,33	0
Dmel_Sl_C3_F	46,98	0	44	9,02
Dsub_Sl_C3_M	0	93,16	6,82	0,02
Dsub_C3_Sl_L	0,02	49,67	44,86	5,28
Dsub_Sl_C3_F	0	89,13	10,82	0,04
Dsub_K_St_M	0	0,26	99,74	0
Dmel_K_St_M	88,36	0,9	0,13	10,01
Dmel_K_St_F	43,37	0,84	1,37	54,37
Dmel_St_K_L	21,33	0,24	78,19	0,23
Dsub_Sl_St_M	0	71,74	28,23	0,03

Prilog 5. Rezultati PERMANOVE korišćenjem DPCoA udaljenosti kod vrste *D. melanogaster*, između supstrata (standardni i olovni) i polova u eksperimentu Standard/olovo F35.

Faktor	df	SS	MS	F	R ²	p
Supstrat	1	0,049544	0,049544	6,425213	0,129873	0,02
Pol	2	0,157268	0,078634	10,19778	0,412255	0,00
Supstrat × pol	2	0,128405	0,064202	8,326199	0,336595	0,02
Reziduali	6	0,046265	0,007711		0,121278	
Ukupno	11	0,381481			1	

Napomena: df – stepen slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrijednost kvadrata; F – vrijednost F testa; R² – procenat varijanse objašnjen kroz grupe; p – nivo značajnosti, statistički značajne vrednosti su zatamnjene.

Prilog 6. Rezultati PERMANOVE korišćenjem DPCoA udaljenosti kod vrste *D. subobscura*, između supstrata (standardni i olovni) i polova u eksperimentu Standard/olovo F35.

Faktor	df	SS	MS	F	R ²	p
Supstrat	1	0,030573	0,030573	5,211108	0,31789	0,08
Pol	2	0,028175	0,014087	2,401167	0,292954	0,17
Supstrat × pol	2	0,002226	0,001113	0,189668	0,02314	0,84
Reziduali	6	0,035201	0,005867		0,366015	
Ukupno	11	0,096174			1	

Napomena: df – stepen slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrijednost kvadrata; F – vrijednost F testa; R² – procenat varijanse objašnjen kroz grupe; p – nivo značajnosti.

Prilog 7. Bonferroni post hoc analiza za osobinu preživljavanje od jaja do adulta.

Populacija	Supstrat	Vrsta	(1) (0,88)	(2) (0,73)	(3) (0,59)	(4) (0,78)	(5) (0,73)	(6) (0,81)	(7) (0,51)	(8) (0,72)
K	St	Dmel		0,00	0,00	0,02	0,00	0,33	0,00	0,00
K	St	Dsub	0,00		0,00	1,00	1,00	0,21	0,00	1,00
K	C3	Dmel	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,11	0,00
K	C3	Dsub	0,02	1,00	0,00		1,00	1,00	0,00	1,00
Sl	St	Dmel	0,00	1,00	0,00	1,00		0,3	0,00	1,00
Sl	St	Dsub	0,33	0,21	0,00	1,00	0,3		0,00	0,12
Sl	C3	Dmel	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00		0,00
Sl	C3	Dsub	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	0,12	0,00	

Prilog 8. Bonferroni post hoc analiza za osobinu dužina razvića.

Populacija	Supstrat	Vrsta	Pol	(1) (19,24)	(2) (19,57)	(3) (20,87)	(4) (20,58)	(5) (20,74)	(6) (21,51)	(7) (22,55)	(8) (22,69)	(9) (19,38)	(10) (19,78)	(11) (21,51)	(12) (21,42)	(13) (20,54)	(14) (21,08)	(15) (22,96)	(16) (23,06)
K	St	D mel	F		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K	St	D mel	M	1,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K	St	D sub	F	0,00	0,00		1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	1,00	1,00	0,00	0,00
K	St	D sub	M	0,00	0,00	1,00		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,10	0,00	0,00
K	C3	D mel	F	0,00	0,00	1,00	1,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	0,00
K	C3	D mel	M	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,39	0,00	0,00
K	C3	D sub	F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	0,07
K	C3	D sub	M	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00
Sl	St	D mel	F	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,83	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sl	St	D mel	M	0,03	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Sl	St	D sub	F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00		1,00	0,00	0,38	0,00	0,00
Sl	St	D sub	M	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00		0,00	1,00	0,00	0,00
Sl	C3	D mel	F	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,04	0,00	0,00
Sl	C3	D mel	M	0,00	0,00	1,00	0,10	1,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,38	1,00	0,04		0,00	0,00
Sl	C3	D sub	F	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,72	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		1,00
Sl	C3	D sub	M	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	

BIOGRAFIJA AUTORA

Mirjana Beribaka je rođena 25. jula 1990. godine u Sarajevu. Osnovnu i srednju školu je završila u Istočnom Sarajevu. Na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Sarajevu, Odsjeku za biologiju, smjer Genetika je završila osnovne akademske studije 2013. godine, a 2014. godine je na istom fakultetu završila i master akademske studije odbranom master rada pod nazivom „Komparacija različitih multipleksnih sistema u izračunavanju stepena srodstva među bliskim srođnicima“, pod mentorstvom dr Jasmine Čakar, naučne savjetnice na Institutu za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu. Doktorske akademske studije je upisala školske 2014/2015 godine na modulu Genetika, Univerzitetu u Beogradu – Biološkom fakultetu.

Trenutno je zaposlena na Tehnološkom fakultetu Zvornik Univerziteta u Istočnom Sarajevu u zvanju višeg asistenta. Član je Društva genetičara Srbije. Autor i koautor je 11 naučnih radova, od čega su četiri objavljena u časopisima međunarodnog značaja i 17 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja, štampana u cjelini ili u izvodu. Učestvovala je na pet međunarodnih i četiri nacionalna projekta.

Изјава о ауторству

Потписани-а Мирјана Берибака

број индекса Б3054/214

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај повишене концентрације олова на промјене у саставу микробиоте и особине животне историје код *Drosophila melanogaster* и *Drosophila subobscura*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 13. 5. 2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана Берибака

Број индекса Б3054/2014

Студијски програм Биологија (модул Генетика)

Наслов рада Утицај повишене концентрације олова на промјене у саставу микробиоте и особине животне историје код *Drosophila melanogaster* и *Drosophila subobscura*

Ментор др Марина Стаменковић-Радак, редовни професор

Потписани/а Мирјана Берибака

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 13. 5. 2022.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај повишене концентрације олова на промјене у саставу микробиоте и особине животне историје код *Drosophila melanogaster* и *Drosophila subobscura*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 13. 5. 2022.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.