

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alma MEHLE

**MAKROFITI IN BAKTERIJSKE ZDRUŽBE  
SEDIMENTOV V POTOKIH GROSUPELJŠČICA IN  
PODLOMŠČICA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alma MEHLE

**MAKROFITI IN BAKTERIJSKE ZDRUŽBE SEDIMENTOV V  
POTOKIH GROSUPELJŠČICA IN PODLOMŠČICA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MACROPHYTES AND BACTERIAL COMMUNITIES OF SEDIMENTS  
IN STREAMS GROSUPELJŠČICA AND PODLOMŠČICA**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za ekologijo in varstvo okolja Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu za fizikalno biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je potrdila temo in naslov diplomskega dela ter za mentorico imenovala prof. dr. Alenko Gaberščik in za somentorja dr. Alexis Zrimca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Mihael J. Toman  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Alexis Zrimec  
Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o, Ljubljana

Članica: prof. dr. Alenka Gaberščik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Alma Mehle

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd  
DK 579.6: 582(043.2)=163.6  
KG makrofiti/bakterijske združbe sedimentov/okoljska  
ocena/potoki/Grosupeljščica/Podlomščica  
AV MEHLE, Alma  
SA GABERŠČIK, Alenka (mentorica)/ZRIMEC, Alexis (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2010  
IN MAKROFITI IN BAKTERIJSKE ZDRUŽBE SEDIMENTOV V POTOKIH  
GROSUPELJŠČICA IN PODLOMŠČICA  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XII, 89 str., 5 tab., 36 sl., 14 pril., 60 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bil vrednotenje potokov Grosupeljščica in Podlomščica na podlagi razporeditve in pogostosti makrofitov in analize bakterijskih združb v sedimentih. Ugotavljali smo tudi vpliv nekaterih fizikalnih in kemijskih dejavnikov vode na makrofite ter stanje širšega vodnega okolja. V rastnih sezonah 2007 in 2008 smo ocenili stanje vodnega okolja po prirejeni RCE metodi po Petersenu ter habitatne parametre. Popisali smo makrofite, njihovo pogostost in rastno obliko na odsekih vzdolž obeh vodotokov. Jeseni 2007 smo opravili osnovne fizikalne in kemijske meritve ter odvzeli vzorce sedimenta za analizo bakterijskih združb. S pomočjo različnih molekularnih tehnik smo v laboratoriju opravili taksonomsko analizo bakterijskih združb. Skupno smo popisali 31 makrofitovskih taksonov, v Grosupeljščici 15, v Podlomščici pa 28 taksonov. Rezultati fizikalnih in kemijskih meritev vode so pokazali obremenjenost obeh vodotokov s fosfati. Glede na klasifikacijo po Haslamovi v zgornjem delu Grosupeljščice uspevajo makrofiti značilni za vodotoke z nizko vsebnostjo hranil, v nižinskem delu pa za vodotoke s srednjo do visoko vsebnostjo hranil. V Podlomščici v zgornjem delu uspevajo makrofiti značilni za vodotoke s srednjo vsebnostjo hranil, v nižinskem delu pa za vodotoke z visoko vsebnostjo hranil. Na pojavljanje makrofitov imajo največji vpliv spodjedanje brega, detrit, oblika struge in vegetacija obrežnega pasu. Grosupeljščica spada z izjemo prvega odseka v peti, zadnji trije odseki pa v četrti RCE kakovostni razred. Podlomščica spada od izvira do nižinskega dela po metodi RCE v prvi in drugi kakovostni razred. V nižinskem delu spadajo odseki v tretji, četrti in peti RCE kakovostni razred.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd  
 DC 579.6: 582(043.2)=163.6  
 CX macrophytes/bacterial communities of sediments/environmental assessment/streams/Grosupeljščica/Podlomščica  
 AU MEHLE, Alma  
 AA GABERŠČIK, Alenka (supervisor)/ZRIMEC, Alexis (cosupervisor)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
 PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
 PY 2010  
 TI MACROPHYTES AND BACTERIAL COMMUNITIES OF SEDIMENTS IN STREAMS GROSUPELJŠČICA AND PODLOMŠČICA  
 DT Graduation Thesis (University studies)  
 NO XII, 89 p., 5 tab., 36 sl., 14 fig., 60 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB The aim of present work was the assessment of streams Grosupeljščica and Podlomščica regarding the distribution and frequency of macrophytes and analyses of bacterial communities in sediments. We also studied the influence of some physical and chemical parameters of water on macrophytes and the properties of environment. In the growing season 2007 and 2008 we performed environment assessment using RCE method proposed by Petersen and habitat parameters. We performed an inventory of macrophytes, their frequency and growth form in subsequent stretches along both streams. In the fall 2007, we performed physical and chemical analyses of water and sampled sediments for the analysis of bacterial communities. With aid of different molecular techniques we performed taxonomical analysis of bacterial communities in the laboratory. Altogether we found 31 species of macrophytes, 15 in Grosupeljščica and 28 taxa in Podlomščica. The data on physical and chemical parameters of water showed moderate loading with phosphates in both streams. Based on classification by Haslam, macrophytes typical for streams with low nutrient content grow in upper reach of Grosupeljščica and those typical for streams with medium to high nutrient content grow in lower reach. In Podlomščica, macrophytes typical for streams with medium nutrient content grow in upper reach and those typical for streams with high nutrient content grow in lower reach. The parameter exerted the most influence on macrophyte distribution was bank undercutting, detritus, channel structure and vegetation of riparian zone. Grosupeljščica, apart from the first segment, was classified in the V. and the last three segments in IV. RCE quality class. Podlomščica was, from the spring to the lower reach, classified in I. and II. quality class after RCE method. In the lower reach the segments were classified in III., IV and V. RCE quality class.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	IX
KAZALO SLIK .....	X
KAZALO PRILOG.....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XIII
1 UVOD .....	1
2 DELOVNE HIPOTEZE.....	3
3. PREGLED OBJAV .....	4
3.1 MAKROFITI.....	4
3.2 PRILAGODITVE MAKROFITOV NA VODNO OKOLJE .....	5
3.2.1 Morfološke in anatomske prilagoditve.....	5
3.2.1.1 Listi .....	5
3.2.1.2 Steblo .....	6
3.2.1.3 Korenine.....	6
3.2.2 Fiziološke prilagoditve .....	6
3.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA RAST MAKROFITOV .....	7
3.3.1 Fizikalni dejavniki.....	7
3.3.1.1 Svetlobne razmere .....	7
3.3.1.2 Temperatura.....	8
3.3.1.3 Gostota vode.....	8
3.3.1.4 Vodni tok.....	8
3.3.2 Kemijski dejavniki .....	9
3.3.2.1 Raztopljeni plini .....	9
3.3.2.2 Raztopljene soli .....	9
3.3.2.3 pH .....	10
3.3.2.4 Substrat.....	10
3.3.3.1 Kompeticija in herbivorija .....	11
3.4 VLOGA MAKROFITOV V VODNEM EKOSISTEMU .....	11

3.5 MAKROFITI IN ONESNAŽENJE.....	12
3.6 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V VODNIH EKOSISTEMIH .....	13
3.7 VPLIVI NA RAST IN AKTIVNOST BAKTERIJ V VODNEM OKOLJU .....	13
3.7.1 Fizikalni in kemijski dejavniki .....	13
3.7.1.1 Temperatura.....	13
3.7.1.2 pH .....	14
3.7.1.3 Osmotski vplivi na rast mikroorganizmov .....	14
3.7.1.4 Kisik.....	14
3.7.1.5 Nutrienti .....	15
3.7.1.6 Substrat in sedimenti.....	15
3.7.2 Biotski dejavniki .....	16
3.7.2.1 Kompeticija in predacija .....	16
3.8 VLOGA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB V VODNIH EKOSISTEMIH.....	16
3.9 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE IN ONESNAŽENJE .....	17
4. MESTO RAZISKAV .....	18
4.1 LEGA IN GEOGRAFSKE ZNAČILNOSTI OBMOČJA.....	18
4.2 GEOLOŠKA PODLAGA .....	19
4.3 PEDOLOŠKA SESTAVA.....	19
4.5 HIDROGEOGRAFIJA .....	20
4.6 OPIS VODOTOKOV .....	20
4.6.1 Grosupeljščica.....	20
4.6.2 Podlomščica .....	21
5 METODE DE LA .....	23
5.1 DELO NA TERENU .....	23
5.1.1 Fizikalne in kemijske analize vode in odvzem vzorcev sedimentov .....	23
5.1.1.1 Fizikalne in kemijske analize vode.....	23
5.1.1.2 Odvzem vodnih vzorcev in vzorcev sedimenta.....	24
5.1.2 Makrofiti.....	25
5.1.3 Širša okoljska ocena vodotokov in ocena habitatnih parametrov .....	25
5.2. DELO V LABORATORIJU .....	27
5.2.1 Fizikalne in kemijske analize vode .....	27

5.2.2 Bakterijske združbe sedimentov .....	27
5.2.2.1 Izolacija DNA.....	27
5.2.2.2 Čiščenje vzorcev .....	27
5.2.2.3 PCR (Polymerase chain reaction oziroma polimerazna verižna reakcija) ....	27
5.2.2.4 TGGE (toplotno gradientna gelska elektroforeza) .....	32
5.3 OBDELAVA PODATKOV .....	39
5.3.1 Fizikalne in kemijske analize vode .....	39
5.3.2 Makrofiti.....	39
5.3.2.1 Pojavljanje in pogostost makrofitov .....	39
5.3.2.2 Kanonična korespondenčna analiza (CCA) .....	41
5.3.3 Širša okoljska ocena vodotokov.....	41
5.3.4 Ocena habitatnih parametrov .....	42
5.3.5 Bakterijske združbe sedimentov .....	42
6 REZULTATI .....	44
6.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE VODE .....	44
6.1.1 Temperatura vode .....	44
6.1.2 Koncentracija kisika in nasičenost s kisikom .....	45
6.1.3 Električna prevodnost.....	46
6.1.4 pH.....	47
6.1.5 Vsebnost nitratnih ionov.....	47
6.1.6 Vsebnost fosfatnih ionov .....	48
6.2 MAKROFITI.....	49
6.2.1 Pojavljanje in pogostost makrofitov.....	49
6.2.2 Kanonična korenspondenčna analiza (CCA).....	56
6.3 ŠIRŠA OKOLJSKA OCENA VODOTOKOV .....	60
6.4 OCENA HABITATNIH PARAMETROV .....	63
6.4.1 Hitrost vodnega toka .....	63
6.4.2 Tip sedimenta.....	64
6.4.3 Struktura brega.....	65
6.4.4 Tip zaledja .....	66
6.5 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE SEDIMENTOV .....	67



7 DISKUSIJA .....	70
7.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE VODE .....	70
7.2 MAKROFITI.....	72
7.2.1 Grosupeljščica.....	72
7.2.2 Podlomščica .....	73
7.3 ŠIRŠA OKOLJSKA OCENA VODOTOKOV .....	75
7.4 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE SEDIMENTOV .....	76
8 SKLEPI .....	79
9 POVZETEK.....	81
10 VIRI.....	83
ZAHVALA.....	
PRILOGE .....	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Številka in ime lokacije vzorčnih mest za fizikalne in kemijske analize in odvzem sedimentov (KČN: komunalna čistilna naprava) .....	24
Preglednica 2: Petstopenjska lestvica za oceno pogostosti vrste in povezanost masnega indeksa z dejansko biomaso (povzeto po Pall in Janauer, 1995).....	39
Preglednica 3: Seznam rastlinskih vrst popisanih v izbranih vodotokih (G-Grosupeljščica, P-Podlomščica) .....	49
Preglednica 4: Lastne vrednosti, kumulativni pojasnjeni odstotki varianc in korelacijski koeficienti obdelanih podatkov .....	56
Preglednica 5: Dobljene DNA sekvence bakterijskih združb sedimentov in sorodni taksoni. Za vsako sekvenco so navedeni trije najbolj sorodni taksoni. Stopnja različnosti 0 pomeni, da je naša sekvenco zelo sorodna sekvenci dobljenega taksona.....	68

## KAZALO SLIK

Slika 1: Izvir vodotoka Podlomščica .....	22
Slika 2: Podlomščica za iztokom komunalne čistilne naprave Grosuplje .....	22
Slika 3: Zadnji del vodotoka Grosupeljščica .....	22
Slika 4: PCR 30.1.2009 (vzorci od leve proti desni: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, negativna kontrola, marker) .....	32
Slika 5: TGGE perpendicular 21.1.2009 (300 V, 4h, 30-70°C) .....	35
Slika 6: Temperatura vode preučevanih vodotokov 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica) .....	44
Slika 7: Koncentracija kisika v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica) .....	45
Slika 8: Nasičenost vode s kisikom v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica) .....	45
Slika 9: Električna prevodnostv preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica) .....	46
Slika 10: pH preučevanih vodotokov 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica) .....	47
Slika 11: Vsebnost nitratnih ionov v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica) .....	47
Slika 12: Vsebnost fosfatnih ionov v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica; meja detekcije: 0,1 mg/L) .....	48
Slika 13: Razporeditev in pogostost makrofitov vodotoka Grosupeljščica .....	50
Slika 14: Razporeditev in pogostost makrofitov vodotoka Podlomščica .....	51
Slika 15: Relativna rastlinska masa (RPM) makrofitov vodotoka Grosupeljščica .....	52
Slika 16: Relativna rastlinska masa (RPM) makrofitov vodotoka Podlomščica .....	52
Slika 17: Povprečni masni indeks posameznih taksonov vodotoka Grosupeljščica (črne oznake-MMT, bele oznake-MMO) .....	53
Slika 18: Povprečni masni indeks posameznih taksonov vodotoka Podlomščica (črne oznake-MMT, bele oznake-MMO) .....	53

Slika 19: Razmerje povprečnih masnih indeksov MMT in MMO v vodotoku Grosupeljščica; d = 0,5 pomeni, da je bil takson prisoten v polovici pregledanih odsekov, d = 1 pomeni, da je bil takson prisoten v vseh pregledanih odsekih .....	54
Slika 20: Razmerje povprečnih masnih indeksov MMT in MMO v vodotoku Podlomščica; d = 0,5 pomeni, da je bil takson prisoten v polovici pregledanih odsekov, d = 1 pomeni, da je bil takson prisoten v vseh pregledanih odsekih .....	55
Slika 21: Ordinacijski diagram z izbranimi dejavniki okolja in makrofitskimi taksoni .....	58
Slika 22: Ordinacijski diagram z izbranimi dejavniki okolja in odseki izbranih vodotokov (G-Grosupeljščica, P-Podlomščica) .....	59
Slika 23: Širša okoljska ocena vodotoka Grosupeljščica .....	60
Slika 24: Širša okoljska ocena vodotoka Podlomščica .....	61
Slika 25: Število točk in kakovostni razredi odsekov vodotoka Grosupeljščica .....	62
Slika 26: Število točk in kakovostni razredi odsekov vodotoka Podlomščica .....	62
Slika 27: Ocena hitrosti vodnega toka vodotoka Grosupeljščica .....	63
Slika 28: Ocena hitrosti vodnega toka vodotoka Podlomščica .....	63
Slika 29: Ocena tipa sedimenta v vodotoku Grosupeljščica .....	64
Slika 30: Ocena tipa sedimenta v vodotoku Podlomščica .....	64
Slika 31: Ocena strukture brega vodotoka Grosupeljščica.....	65
Slika 32: Ocena strukture brega vodotoka Podlomščica .....	65
Slika 33: Ocena tipa zaledja vodotoka Grosupeljščica .....	66
Slika 34: Ocena tipa zaledja vodotoka Podlomščica .....	66
Slika 35: TGGE 26.2.2009 (220 V, 16h, 40-46°C) .....	67
Slika 36: Drevo sorodnosti DNA sekvenc bakterijskih združb sedimentov v vodotokih Grosupeljščica in Podlomščica. Števila na razvejitvah predstavljajo stopnjo različnosti za določeno število enot .....	69

## **KAZALO PRILOG**

- Priloga A: Slovenska različica RCE metode (Petersen, 1992)
- Priloga B: Metoda popisovanja makrofitov in ocene habitata (Janauer, 2002)
- Priloga C1: Grosupeljščica: koordinate odsekov, njihove dolžine in datumi popisov makrofitov (za vsak odsek sta navedeni koordinati na začetku in na koncu odseka)
- Priloga C2: Podlomščica: koordinate odsekov, njihove dolžine in datumi popisov makrofitov (za vsak odsek sta navedeni koordinati na začetku in na koncu odseka)
- Priloga D1: Pogostost makrofitov po posameznih odsekih vodotoka Grosupeljščica
- Priloga D2: Pogostost makrofitov po posameznih odsekih vodotoka Podlomščica
- Priloga E1: Širša okoljska ocena vodotoka Grosupeljščica
- Priloga E2: Širša okoljska ocena vodotoka Podlomščica
- Priloga F1: Ocena habitatnih tipov vodotoka Grosupeljščica
- Priloga F2: Ocena habitatnih tipov vodotoka Podlomščica
- Priloga G: Rezultati fizikalnih in kemijskih meritev in analiz z dne 14.11.2007 (kemijske analize opravljene dne 22.11.2007 v laboratoriju na IFB)
- Priloga H: Zemljevid območja z vrisanimi vzorčnimi mesti za fizikalno-kemijske analize in odvzem vzorcev sedimentov (Vir: Geopedia.si)
- Priloga I: Zemljevid območja z vrisanimi odseki za popis makrofitov in širšo okoljsko oceno po metodi RCE vodotokov Grosupeljščica in Podlomščica
- Priloga J: Rezultati sekveniranja

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CAM: Crassulacean acid metabolism

CCA: kanonična korespondenčna analiza

DGGE: denaturirajoča gradientna gelska elektroforeza

DNA: deoksiribonukleinska kislina

GPS: Global Positioning System oziroma sistem globalnega določanja položaja

IFB: Inštitut za fizikalno biologijo

KČN: komunalna čistilna naprava Grosuplje

PCR: Polymerase chain reaction oziroma polimerazna verižna reakcija

RCE: River, Channel and Environment Inventory oziroma obrežje, struga in okolje

Mili-q: bidestilirana sterilna voda

MMT: povprečni masni indeks vrste v vseh odsekih vodotoka

MMO: povprečni masni indeks vrste v odsekih, v katerih se ta vrsta pojavlja

BSA: goveji serumski albumin

UV: ultravijolično valovanje

PAR: fotosintezno aktivni spekter sevanja

FR: daljno rdeča svetloba

dNTP: nukleotidi

TBE: tris/borat/EDTA

TGGE: toplotno gradientna gelska elektroforeza

TEMED: tetrametiletilediamin

TAE: tris/acetat/EDTA

RPM: relativna rastlinska masa

RDP: Ribosomal Database Project

NCBI: National center for biotechnology Information

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

## 1 UVOD

Zaradi vedno večje onesnaženosti in degradacije vodotokov, ki so posledica kmetijstva, industrializacije in urbanizacije, je aktualno tako preventivno ukrepanje, kot tudi izboljšanje stanja s pomočjo različnih metod. Prvi korak k izboljšanju je definiranje stanja vodotokov, ki predstavlja osnovo za nadaljnjo sanacijo v primeru, da je ta potrebna (Kelly in Whitton, 1998;). Pomembno je spremljanje kakovosti površinskih voda, ki imajo neposreden vpliv na podtalnico, torej na pitno vodo. Vodotoki in ostali vodni habitati tudi podpirajo obstoj številnih vrst, na katere ima degradacija oziroma onesnaženje negativne posledice (Urbanič in Toman, 2003).

Cilj naših raziskav sta bila potoka Grosupeljščica in Podlomščica v Grosupeljski kotlini. Potoka tečeta od izvira prek kmetijskih in urbanih površin proti Radenskemu polju. V Podlomščico se izteka tudi odpadna voda iz Komunalne čistilne naprave Grosuplje. Potoka se zlijeta tik pred Radenskim poljem, ki spada pod območje Natura 2000 in nadaljujeta pot pod imenom Dobravka (Peterlin, 2007). Manjši vodotoki, kot sta Grosupeljščica in Podlomščica, imajo ključen pomen za ekološko funkcijo rečnega sistema, saj vplivajo na kakovost vode, ki doteka v večje reke. So pomembni reproduktivni habitati in rezervoarji za rekolonizacijo organizmov, ki sledi večjim motnjam v ekosistemu. Prav na manjše vodotoke pa ima urbanizacija največji vpliv. Posledice urbanizacije so izguba kompleksnosti mreže vodotokov zaradi regulacije in melioracije in povečan vnos polutantov (Balanson in sod., 2005).

Kakovost voda ugotavljamo na podlagi fizikalnih in kemijskih parametrov vodnega okolja ali z biološkimi metodami, pri interpretaciji pa so v pomoč tudi hidromorfološki parametri kot so: globina vode, hitrost vodnega toka, turbulenca, pretok vode, tip substrata. Fizikalno-kemijski parametri odražajo trenutno stanje, saj se le-ti v vodotoku lahko hitro spreminjajo. Prednost bioloških analiz pred fizikalno-kemijskim je ta, da odražajo stanje v daljšem časovnem obdobju, saj temeljijo na pojavljanju oziroma odsotnosti (predvsem indikatorskih) vrst (Urbanič in Toman, 2003).

Za vrednotenje izbranih vodotokov smo izbrali makrofite in bakterijske združbe, ki so elementi biološkega vrednotenja vodotokov. Vzporedno smo opravili tudi ekomorfološko vrednotenje vodotokov, ki obsega različne morfološke in biotske parametre vodotoka, ki jih primerjamo s potencialnim naravnim stanjem vodotoka (Urbanič in Toman, 2003). Poleg tega se merijo tudi fizikalni in kemijski parametri in določijo se habitatni parametri, ki pripomorejo k pravilni interpretaciji rezultatov ([http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www\\_en51/en51e\\_pdf/en51e\\_pet.pdf](http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www_en51/en51e_pdf/en51e_pet.pdf)).

Z izrazom makrofiti označujemo rastlinske vrste, ki so prilagojene na življenje v vodi, oziroma uspevajo na tleh nasičenih z vodo (Hernandez in Mitsch, 2002). Številne mednarodne direktive vključujejo makrofite v monitoring ekološkega stanja voda vključno z Evropsko vodno direktivo, na kateri temelji tudi spremljanje stanja rek v Sloveniji (Water quality... , 2003). So zelo dobri bioindikatorji, saj so občutljivi na habitat v katerem živijo, zato njihova prisotnost, pogostost in vzorec pojavljanja odražajo stanje vodnega okolja oziroma razmere v njem (Haslam, 2006). Enako velja tudi za bakterijske združbe sedimentov, ki igrajo ključno vlogo v trofični mreži in geokemičnih ciklih znotraj vodnih ekosistemov. Bakterijske združbe so neposredno odvisne od fizikalno-kemijskih karakteristik vodnega okolja, zato spremembe v vodnem okolju vplivajo tudi na bakterijske združbe (Lawrence in sod., 2004).

Namen naloge je bil:

- Ugotoviti stanje vodotokov Grosupeljščica in Podlomščica na podlagi makrofitov, bakterijskih združb v sedimentih ter vpliv nekaterih fizikalnih in kemijskih dejavnikov nanje.
- Ugotoviti stanje širšega vodnega okolja.
- Primerjati vrednotenje vodotokov na podlagi makrofitov in analize bakterijskih združb sedimentov kot parametrov za določanje stanja.



## 2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pojavile se bodo razlike v prisotnosti in pogostosti pojavljanja makrofitov vzdolž posameznih vodotokov in med obema vodotokoma. Vrstna sestava in zastopanost posameznih vrst se bo v Podlomščici spremenila za iztokom iz komunalne čistilne naprave Grosuplje, vplivi pa se bodo kazali dolvodno.
- Na različnih delih vodotokov se bodo pojavljale različne bakterijske združbe sedimentov. V Podlomščici bodo neposredno za iztokom iz komunalne čistilne naprave združbe značilne za močno obremenjene vode, vplivi pa se bodo kazali dolvodno.
- Predvidevamo, da se bodo bakterijske združbe v sedimentih in združba makrofitov spreminjali glede na dejavnike okolja.
- Predvidevamo, da bo Grosupeljščica po celotni pregledani dolžini vodotoka spadala v enega slabših RCE kakovostnih razredov, predvsem na račun zaledja in regulacije struge. Predvidevamo, da bo Podlomščica v zgornjem delu toka spadala v boljši RCE klakovostni razred kot v spodnjem delu, predvsem zaradi spremembe zaledja in morfologije struge.

### 3. PREGLED OBJAV

#### 3.1 MAKROFITI

S pojmom makrofiti označujemo vse s prostim očesom vidne vodne rastline in sicer semenke, mahove in makroskopske alge. Makrofite glede na rastno obliko, način pritrditve in položaj v vodnem stolpcu uvrščamo v pet različnih skupin (Trošt-Sedej, 2005).

Prva skupina so emerzni makrofiti oziroma helofiti. So ukoreninjeni in razvijejo večino asimilacijskih tkiv nad vodno gladino (Greenaway, 2006). V to skupino uvrščamo nizke in visoke enokaličnice, nizke dvokaličnice in nekaj visokih dvokaličnic, na primer jezerski biček (*Schoenoplectus lacustris*), navadni trst (*Phragmites australis*) in širokolistni rogoz (*Typha latifolia*) (Haslam, 2006).

Hidrofiti ali prave vodne rastline se razvijajo in rastejo pretežno v vodi in jih delimo v štiri skupine in sicer na plavajoče ukoreninjene in neukoreninjene makrofite ter potopljene ukoreninjene in neukoreninjene makrofite (Trošt-Sedej, 2005). Plavajoči oziroma natantni makrofiti imajo liste plavajoče na vodni gladini. Ukoreninjeni imajo poleg plavajočih lahko tudi nekaj potopljenih listov in so s koreninami zasidrani v substrat. Neukoreninjeni imajo zgolj prosto plavajoče liste in s koreninami niso zasidrani v substrat (Greenaway, 2006; Trošt-Sedej, 2005). Med prve sodijo na primer rumeni blatnik (*Nuphar luteum*) in beli lokvanj (*Nymphaea alba*), med neukoreninjene pa na primer mala vodna leča (*Lemna minor*) in vodna hijacinta (*Eichornia crassipes*) (Trošt-Sedej, 2005). Potopljeni ukoreninjeni makrofiti, kot na primer kodravi dristavec (*Potamogeton crispus*), klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) in različne alge rodov *Chara* in *Nitella*, imajo liste in poganjke potopljene pod vodo in so s koreninami pritrjeni na substrat. Potopljeni neukoreninjeni makrofiti imajo tkiva potopljena pod vodo in prosto plavajo v vodnem stolpcu. Mednje sodijo predstavniki iz rodov mešink (*Utricularia*), rogoolistov (*Ceratophyllum*) in trožilna vodna leča (*Lemna triscula*) (Haslam, 2006).

Nekatere vrste uspevajo tako na vodi kot na kopnem. Imenujemo jih amfibijske rastline. Te se na morfološki, anatomski in fiziološki ravni prilagodijo različnim razmeram v okolju, tako da lahko uspevajo potopljene, ko se vodna gladina zniža in so izpostavljene zraku in tudi, ko so popolnoma na suhem. To so na primer, trpotčasti porečnik (*Alisma plantago-*

*aquatica*), vodna dresen (*Polygonum amphibium*) in vodna meta (*Mentha aquatica*) (Trošt-Sedej, 2005).

## 3.2 PRILAGODITVE MAKROFITOV NA VODNO OKOLJE

### 3.2.1 Morfološke in anatomske prilagoditve

Makrofiti imajo številne morfološke in anatomske prilagoditve na vodno okolje. Imenujemo jih hidromorfoze (Trošt-Sedej, 2005).

#### 3.2.1.1 Listi

Potopljeni listi imajo povečano razmerje med površino in prostornino, kar jim omogoča učinkovitejše sprejemanje plinov, hranil in vode. Listi potopljenih rastlin so zato pogosto tanki in razcepljeni, kar jih hkrati ščiti pred fizičnimi poškodbami zaradi vodnega toka. Listna povrhnjica je enoplastna ali manjka, kutikula je slabo razvita, zato dobro prepušča vodo. V povrhnjici so razvite hidropote, ki služijo absorpciji ionov iz vode. Na potopljenih listih so razvite hidatode, ki izločajo čisto vodo iz rastline. Tako poteka transpiracija tudi pri potopljenih listih. Listne reže niso razvite ali pa so nefunkcionalne. Hranila lahko absorbirajo preko korenin ali iz vode preko celotne površine. Mezofil potopljenih listov je tanjši kot pri kopnih rastlinah, kar omogoča lažji prehod svetlobe in snovi. Asimilacijsko tkivo je grajeno kot enoten asimilacijski parenhim. Kloroplasti so lahko prisotni tudi v listni povrhnjici kar omogoča boljši izkoristek svetlobe. Prevajalno tkivo je zaradi absorpcije prek celotne površine slabo razvito, zmanjšan je tudi obseg opornega tkiva, katerega vlogo prevzame vodni medij (Trošt-Sedej, 2005; Wetzel, 2001).

Posebnost vodnih rastlin je zračno tkivo ali aerenhim. To je sistem zračnih prostorov, ki poteka od listov do korenin in omogoča prehajanje plinov. Tako prehaja kisik iz zraka prek listov in stebel v korenine, kjer ga pogosto primanjkuje. Ravno obratno pa prehajata ogljikov dioksid in metan, ki nastajata v tleh. Ogljikov dioksid iz tal in ogljikov dioksid, ki nastaja pri dihanju prehajata v aerenhim in od tu v fotosintezno aktivna tkiva, kar prispeva k večji jakosti fotosinteze. Poleg tega aerenhim tudi zmanjšuje specifično težo rastline in s tem potrebo po opornem tkivu (Wetzel, 2001).

Plavajoči listi imajo enostavno morfologijo, največkrat so okrogli, ščitasti, ledvičasti ali podolgovati. So debelejši od potopljenih, povrhnjica je enoplastna, vendar dobro razvita in pokrita z debelo kutikulo in epikutikularnimi voski, kar omogoča odtekanje vode in povečuje odboj svetlobe z listne površine. Listne reže so goste, nameščene na zgornji strani lista. Na spodnji strani lista so razvite hidropote. Mezofil je diferenciran, obseg prevajalnega in opornega tkiva je zmanjšan. Aerenhim je razvit v listni ploskvi in listnem peclju, kar omogoča, da list plava na vodi (Trošt-Sedej, 2005; Wetzel, 2001).

V povezavi z različnimi okoljskimi razmerami se na isti rastlini razvijejo različno zgrajeni listi. Pojav imenujemo heterofilija. Tako se pri vodnih rastlinah razvijejo submerzni, natantni in emerzni listi, odvisno od nivoja vodne gladine. Na ta način rastlina ohranja veliko fotosintezno učinkovitost in produkcijo v različnih okoljskih razmerah (Trošt-Sedej, 2005).

#### 3.2.1.2 Steblo

Vodne rastline imajo enoplastno stebelno povrhnjico, prekrita s tanko kutikulo. Pogosto so prisotne hidropote, listnih rež običajno ni. Obseg opornega in prevajalnega tkiva je zmanjšan, kar daje podvodnim stebлом elastičnost in gibkost in jih ščiti pred poškodbami zaradi vodnega toka. Pri nekaterih rastlinah so razviti le skupki prevajalnih celic, pravih žil ni. Običajno je aerenhim dobro razvit (Trošt-Sedej, 2005).

#### 3.2.1.3 Korenine

Pri neukoreninjenih makrofitih imajo korenine vlogo črpanja vode in hranil, pri ukoreninjenih pa vlogo pritrjevanja in črpanja hranil. Nekateri hidrofiti so popolnoma izgubili koreninski sistem, na primer vodna lečica (*Wolffia arrhiza*) in rogolisti (*Ceratophyllum*). Tudi pri koreninah se lahko razvije aerenhim in sicer v primarni skorji (Trošt-Sedej, 2005).

### 3.2.2 Fiziološke prilagoditve

V vodnem mediju so fizikalni in kemični parametri različni kot na kopnem, kjer rastline obdaja zrak. Zato so vodne rastline razvile različne fiziološke prilagoditve na vodno okolje.

Posledica nizke svetlobne jakosti in velike difuzijske upornosti za ogljikov dioksid in kisik v vodi je manjša jakost neto fotosinteze v primerjavi s kopsnimi rastlinami. Potopljene rastline so se prilagodile z nizko svetlobno saturacijsko točko in visoko saturacijsko točko fotosinteze za CO<sub>2</sub> (Trošt-Sedej, 2005). Rastline so zato razvile različne mehanizme za povečanje intracelularne vsebnosti ogljikovega dioksida:

- Nekaterе vrste imajo encim fosfoenol piruvat (PEP) karboksilazo tako kot kopenske C<sub>4</sub> rastline, vendar brez celic žilnega ovoja (Chambers in sod., 2008).
- Nekaterе rastline izkoriščajo povečano vsebnost CO<sub>2</sub> v nočnem času, podobno kot kopenske CAM rastline, na primer predstavniki rodov *Isoetes* (Wetzel, 2001).
- Številne vrste so sposobne poleg CO<sub>2</sub> sprejemati tudi hidrogenkarbonatni ion, na primer kodravi dristavec (*Potamogeton crispus*), klasasti rmanec (*Myriophyllum spicatum*) in številne alge.
- Nekaterе rastline s pomočjo anatomskih prilagoditev delno izrabljajo CO<sub>2</sub>, ki nastaja pri fotorespiraciji in dihanju (Trošt-Sedej, 2005).
- Nekaterе rastline uporabljajo CO<sub>2</sub>, ki nastaja v substratu (Chambers in sod., 2008).

### 3.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA RAST MAKROFITOV

#### 3.3.1 Fizikalni dejavniki

##### 3.3.1.1 Svetlobne razmere

Svetloba je eden glavnih abiotskih faktorjev, ki omejujejo rast rastlin v vodi (Mackay in Marsh, 2005). Sevalne razmere se v vodi spreminjajo z globino in količino v vodi raztopljenih in suspendiranih delcev. Voda relativno dobro prepušča fotosintezno aktivni spekter sevanja (PAR) in močno absorbira valovne dolžine nad 700 nm, torej daljno rdečo svetlobo (FR). Posledica je spremenjena spektralna sestava sevanja. Sevalne razmere določajo razporeditev vodnih rastlin v globino in njihovo pogostost (Trošt-Sedej, 2005).

Na sevalne razmere vplivajo tudi naklon obrežja in obrežna vegetacija, perifiton v vodi, gibanje vode in drugi dejavniki. Jakost sevanja je v vodi zaradi odboja od vodne površine in absorbcije pri prehajanju skozi vodo manjša kot v zraku in z globino upada, zato je

produktivnost submerznih makrofitov praviloma manjša kot pri kopenskih rastlinah. Poleg tega obrežje z vegetacijo in tudi same vodne rastline s senčenjem zmanjšujejo jakost sevanja (Haslam, 2006).

#### 3.3.1.2 Temperatura

Temperatura vode se spreminja počasneje in ima manjši vpliv na pojavljanje vrst kot na kopnem, saj so redke vrste omejene zgolj na hladne ali tople vode. Temperatura vpliva na številne fiziološke procese, na primer na dormanco, kalitev semen in razvoj rastline, fotosintezo in dihanje (Trošt-Sedej, 2005).

#### 3.3.1.3 Gostota vode

Voda ima veliko gostoto v primerjavi z zrakom, kar vpliva na morfološke in anatomske lastnosti vodnih rastlin. Oporno vlogo prevzame vodni medij, zato oporna tkiva izgubljajo svojo vlogo in so slabo razvita (Trošt-Sedej, 2005).

#### 3.3.1.4 Vodni tok

Vodni tok je eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na vodno vegetacijo. Na rastline vpliva neposredno, saj lahko fizično poškoduje rastline. Poleg tega ima tudi neposredni vpliv na hitrost metabolizma, dostopnost hranil in plinov, prenaša pa tudi strupene in nevtralne substance ter razmnoževalne organe vodnih rastlin (Trošt-Sedej, 2005).

Posredno vodni tok vpliva na rastline prek vpliva na substrat, saj hitrejši tok odnaša manjše delce in posledično v hitrejših vodotokih substrat gradijo večji delci. Hiter tok erodira manjše delce, počasnejši pa ravno obratno povzroča odlaganje delcev. Določene vrste lahko preferirajo določen tip substrata ali pa uspevajo na določenem predelu zato, ker preferirajo tip vodnega toka, povezanega z določenim tipom substrata. Nekatere vrste zato bolje rastejo v stoječi vodi, druge pa v tekoči (Haslam, 2006).

### 3.3.2 Kemijski dejavniki

Na kemizem vode vplivajo: geološka podlaga, tip obrežja in človekovo delovanje. Kemizem vode pomembno vpliva na pogostost in pojavljanje posameznih rastlinskih vrst v vodnem okolju. Na uspevanje vrst vplivajo predvsem: pH ter količina suspendiranih in raztopljenih snovi, predvsem hranil in plinov (Fortner in White, 1988; Trošt-Sedej, 2005).

#### 3.3.2.1 Raztopljeni plini

V vodi je difuzijska upornost velika, zato je difuzija plinov ogljikovega dioksida in kisika za faktor  $10^4$  počasnejša kot v zraku. Nihanja teh dveh plinov so v manjših, gosto zaraslih vodnih telesih večja kot v zraku. Nihanja so posledica fotosintezne aktivnosti rastlin, saj rastline podnevi porabljajo  $\text{CO}_2$  za fotosintezo pri kateri se sprošča kisik, ponoči pa porabljajo  $\text{O}_2$  za dihanje, pri čemer nastaja  $\text{CO}_2$ .  $\text{CO}_2$  v vodi tvori ogljikovo kislino ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), ki disociira v karbonatni ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) in hidrogenkarbonatni ion ( $\text{HCO}_3^-$ ). Ravnotežje med tremi oblikami ogljika ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ) je odvisno od pH vode. Pri kislem pH prevladuje  $\text{CO}_2$ , pri nevtralnem bazičnem  $\text{HCO}_3^-$ , pri bazičnem pH pa prevladuje  $\text{CO}_3^{2-}$ . Vir ogljika, ki so ga rastline sposobne asimilirati, pomembno vpliva na njihovo sposobnost rasti v določenem vodnem okolju (Trošt-Sedej, 2005, Wetzel, 2001).

#### 3.3.2.2 Raztopljene soli

Soli prehajajo v vodo iz zraka, tal in bazične kamnine ter tudi kot posledica človekovega delovanja. Za rastline so najpomembnejši ioni soli, ki jih rastline potrebujejo za rast in razvoj oziroma hranila kot sta dušik in fosfor (Trošt-Sedej, 2005). Povečane koncentracije fosforja in dušika imajo za posledico povečano primarno produkcijo. Limitirajoč dejavnik v vodnem ekosistemu je fosfor. Njegovo pomanjkanje vpliva na rast in razvoj rastlin. Nutrienti se v manjši količini sproščajo v vodo tudi med aktivno rastjo potopljenih makrofitov, večje količine pa se sproščajo kot posledica senescence in odmrtnosti rastlin (Wetzel, 2001).

Emerzni makrofiti sprejemajo hranila iz substrata na katerega so pritrjeni. Potopljeni makrofiti večinoma sprejemajo hranila prek celotne površine iz vode, ukoreninjeni pa tudi iz substrata na katerega so pritrjeni. Ko rastlina absorbira nutiente, jih v neposredni

okolici absorpcije, na primer v vodi okoli listov začne primanjkovati, zato je privzemanje novih nutrientov vedno težje. Difuzija in vodno gibanje prinašata nove nutriende. Zato je tekoča voda za rastline bogatejša z nutrienti kot stoječa (Haslam, 2006).

#### 3.3.2.3 pH

PH vodnega okolja je odvisen od geološke podlage in samih rastlin v vodi. PH se lahko dnevno in sezonsko spreminja. Značilna so velika dnevno-nočna nihanja pH v manjših z makrofiti močno poraslih vodnih telesih, ki so posledica fotosinteze in dihanja rastlin. Vodne rastline večinoma najbolje uspevajo v nevtralnem območju pH, precejšnjemu številu vrst ustreza bazično okolje med pH 10 in 11, redke pa uspevajo v zelo kislem okolju, kjer je pH nižji od 4 (Trošt-Sedej, 2005).

#### 3.3.2.4 Substrat

Substrat je odvisen od vodnega toka in vpliva na razporeditev rastlin v vodi. Nekatere vrste rastejo bolje na finejšem substratu, druge na bolj grobem (Haslam, 2006). Intersticielna voda v substratu vsebuje več organske snovi, ionov in nutrientov kot enaka prostornina površinske vode. Zato je talni substrat za makrofite glavni vir nutrientov (Haslam, 2006; Fortner in White, 1988). Nutrienti so večinoma prisotni v drobnozrnatem substratu kot sta mulj in blato. Organski delci se zaradi majhne specifične teže hitro izperejo s tokom, zato je v hitrejših vodotokih z bolj grobim substratom manj organskih snovi in manj hranil, kar vpliva tudi na pojavljanje makrofitov (Haslam, 2006). Na razporeditev rastlin v vodi vpliva tudi dejstvo, da se v grobem substratu in v rahlih finih usedlinah rastline težko ukoreninijo (Trošt-Sedej, 2005).



### 3.3.3 Biotski dejavniki

#### 3.3.3.1 Kompeticija in herbivorija

Na rast rastlin vplivata tudi kompeticija in herbivorija. Rastline med seboj tekmujejo neposredno za prostor, na primer s sproščanjem snovi, ki zavirajo rast drugih rastlin. Posredno tekmujejo za različne vire, na primer za nutriente in svetlobo. Herbivorija s strani insektov, polžev, rakov, rib in nekaterih drugih živalskih skupin lahko prispeva od 5 do 10% izgubo rastlinske biomase. Pri poganjkih, ki so nad vodo pa je izguba biomase tudi do 25% (Wetzel, 2001).

### 3.4 VLOGA MAKROFITOV V VODNEM EKOSISTEMU

Makrofiti prispevajo k biodiverziteti, tako s svojo prisotnostjo, kot s povečevanjem števila mikrohabitatom. Vodne rastline nudijo zavetje ribjim mladim in nevretenčarjem in predstavljajo substrat za nevretenčarje in epifitske alge. Kot primarni producenti so vir hranil drugim organizmom. Makrofiti s koreninami stabilizirajo bregove in dno vodnih teles in tako preprečujejo erozijo. Vplivajo tudi na hitrost in smer vodnega toka, v stoječih vodah pa blažijo učinke valovanja. Vendar pa povečan razvoj vodne vegetacije zmanjša vodno površino in zniža temperaturo vode (Joniak in sod., 2007; Trošt-Sedej, 2005). V sestojih makrofitov je hitrost vodnega toka upočasnjena, zato se tu kopičijo mulj, pesek in prod pa tudi hranila, strupene snovi in mikroorganizmi (Greenaway, 2006).

Sestoji makrofitov prispevajo k samočistilni sposobnosti vode, saj filtrirajo, transformirajo, absorbirajo in akumulirajo polutante. V proces čiščenja se vključujejo neposredno ali pa posredno prek mikroorganizmov in perifitona, ki poseljujejo površino rastlin (Haslam, 2006). Makrofiti lahko povzročijo tudi eutrofikacijo z mobilizacijo hranil iz substrata in, ko se sproščajo hranila po njihovem odmiranju (Trošt-Sedej, 2005). Vloga makrofitov pri kroženju nutrientov je odvisna od okoljskih dejavnikov ter strukture, biomase in življenjskega cikla rastlin (Joniak in sod., 2007).

Makrofiti tudi oksigenirajo vodo in vplivajo na koncentracijo ogljikovega dioksida in pH vode. Kadar je zahteva po kisiku velika, so rastline najpomembnejše za povečanje

koncentracije kisika v vodi. Poleg naštetega imajo makrofiti z različnimi oblikami, barvami in razporeditvijo tudi estetsko vrednost v vodnih ekosistemih (Haslam, 2006).

### 3.5 MAKROFITI IN ONESNAŽENJE

Makrofiti so uporabni bioindikatorji, saj jih lahko opazimo in identificiramo s prostim očesom. Poleg tega je število vrst obvladljivo, da se jih lahko naučimo prepoznavati. Makrofiti tudi niso mobilni, tako kot živali, ki nam lahko uidejo. Ker so različne vrste makrofitov različno občutljive na različne polutante, se vegetacijski vzorci vodnih rastlin razlikujejo in njihova prisotnost, pogostost in vzorec pojavljanja posredno odražajo tip onesnaženja oziroma prisotnost različnih polutantov (Haslam, 2006). Povečan vnos hranil ima lahko za posledico povečanje biomase, spremembo v vrstni sestavi makrofitov in sčasoma vodi v zmanjšanje vrstne diverzitete (Gücker in sod., 2006; Scott in sod., 2000). Spremembe v strukturi združbe in abundanci posameznih vrst nam lahko povedo zakaj in kako se ekosistem spreminja (Scott in sod., 2000). Večje, ko je število vrst ali pogostejše, ko se pojavljajo, bolj natančna je diagnoza (Haslam, 2006).

### 3.6 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V VODNIH EKOSISTEMIH

Bakterijske združbe v vodnih ekosistemih lahko uvrstimo v štiri skupine: prostoživeče planktonske bakterije, bakterije v agregatih v vodnem stolpcu, bakterije v drobnozrnatih sedimentih in bakterije pritrjene na potopljene površine (Chénier in sod., 2005; Palumbo in sod., 1987). Različne površine so pomembni habitati mikroorganizmov, saj se nutrienti vežejo nanje. Posledično sta običajno tako število kot aktivnost mikroorganizmov veliko večja na površinah, kot v prosti vodi. Pogosto mikroorganizmi na površinah tvorijo biofilme-skupke bakterijskih celic, ki so pritrjene na površino in obdane s polisaharidnimi izločki celic. Biofilmi v tekočih vodah lovijo nutiente in preprečujejo, da bi se celice ločile od podlage (Madigan in Martinko, 2006). V nekaterih vodotokih lahko bakterije v biofilmih predstavljajo kar 90% ali več celotne bakterijske populacije (Chénier in sod., 2005).

### 3.7 VPLIVI NA RAST IN AKTIVNOST BAKTERIJ V VODNEM OKOLJU

#### 3.7.1 Fizikalni in kemijski dejavniki

Rast mikroorganizmov v naravi je odvisna od razpoložljivih nutrientov in rastnih pogojev. Kemijski in fizikalni dejavniki v okolju imajo velik vpliv na mikroorganizme. Razumevanje okoljskih dejavnikov nam pomaga razložiti razporeditev mikroorganizmov v naravi. Ključni abiotski dejavniki, ki vplivajo na rast in aktivnost mikroorganizmov so: temperatura, pH, kisik in količina vode, ki je na razpolago (Madigan in Martinko, 2006).

##### 3.7.1.1 Temperatura

Vsaka vrsta mikroorganizmov ima svoj temperaturni optimum pri kateremu je rast najhitrejša, temperaturni minimum, pod katerim se rast ustavi in temperaturni maksimum, to je temperatura, nad katero rast ni več mogoča, zaradi denaturacije proteinov. Glede na različne temperaturne optime različnih mikroorganizmov le-te uvrščamo v štiri skupine: psihofilni, mezofilni, termofilni in hipertermofilni mikroorganizmi. Bakterije v vodnih ekosistemih zmernih klimatov sodijo med mezofilne mikroorganizme. Mezofilne bakterije imajo temperaturni optimum v območju od 20°C do 40°C (Madigan in Martinko, 2006).

### 3.7.1.2 pH

Vsak mikroorganizem najbolje raste v določenem pH območju, ki ga imenujemo pH optimum. Enako kot velja pri temperaturi, imajo različni mikroorganizmi različni pH optimum, minimum in maksimum. Mikroorganizme, ki najbolje rastejo pri nizkem pH, imenujemo acidofilni, tiste, ki najbolje rastejo pri visokem pH pa alkalofilni. Najpogostejši so mikroorganizmi, ki imajo pH optimum v območju med pH 5 in pH 9, kakršen je tudi pH večine naravnih okolij (Madigan in Martinko, 2006). Ph sedimentov v vodnih ekosistemih niha mnogo manj kot pH proste vode nad njimi, zaradi delovanja bakterijskih združb v sedimentih. Zato na bakterijske združbe sedimentov bolj vpliva vsebnost organske snovi, kot pH proste vode. Bakterije na kamnitih površinah sprememba pH prizadene bolj kot bakterije v finih sedimentih (Palumbo in sod., 1987).

### 3.7.1.3 Osmotski vplivi na rast mikroorganizmov

Količina vode, ki je na razpolago mikroorganizmom, je pomemben dejavnik, ki vpliva njihovo rast. Dostopnost vode za mikroorganizme ni odvisna samo od količine vode v habitatu, ampak tudi od koncentracije raztopin v vodi. Raztopljene snovi namreč vežejo vodo nase in tako vezana voda mikroorganizmom ni na razpolago. Ker voda prehaja prek membran po zakonu osmoze, v celinskih vodah mikroorganizmi nimajo težav s pomanjkanjem vode. Težave s privzemanjem vode se pojavijo v habitatih z visoko koncentracijo soli, na primer v morskih habitatih (Madigan in Martinko, 2006).

### 3.7.1.4 Kisik

Kisik je slabo topen v vodi in zaradi respiracije mikroorganizmov lahko v vodnem okolju, še posebej tam, kjer je veliko organskega materiala, pride do pomanjkanja kisika. Zato so anoksični habitati v naravi pogosti, na primer v sedimentih, močvirjih in z vodo nasičenih tleh. V tekočih vodah lahko kljub mešanju vode zaradi vodnega toka in turbulenc pride do pomanjkanja kisika, v primeru večjega vnosa organskega materiala v obliki komunalnih odplak ter agrikulturnih in industrijskih polutantov. Z oddaljevanjem od mesta onesnaženja, se organska snov postopoma konzumira in vsebnost kisika se normalizira (Madigan in Martinko, 2006).

Mikroorganizme umeščamo v različne skupine glede na potrebe po kisiku ali toleranco na kisik. Aerobne vrste lahko rastejo pri običajnih koncentracijah kisika, anaerobne vrste pa rastejo v odsotnosti kisika. Poleg tega nekateri mikroorganizmi lahko rastejo tako v oksičnih kot v anoksičnih pogojih. Pravimo jim fakultativni aerobi. Anaerobni mikroorganizmi so lahko striktni anaerobi, kar pomeni, da rastejo samo v popolni odsotnosti kisika, ali pa so aerotolerantni anaerobi, kar pomeni, da tolerirajo kisik in lahko rastejo tudi v njegovi prisotnosti (Madigan in Martinko, 2006).

#### 3.7.1.5 Nutrienti

Mikrobiološka aktivnost je v vodnem ekosistemu odvisna od primarne produkcije fototrofnih organizmov (Madigan in Martinko, 2006). V vodotokih, kjer obrežna vegetacija močno zasenči vodotok, je heterotrofni metabolizem odvisen od raztopljenih in suspendiranih organskih snovi, ki pade v vodno strugo, ali pride v strugo s površinsko ali podtalno vodo (Wetzel, 2001).

Koncentracija nutrientov lahko vpliva na bakterijsko biomaso in strukturo bakterijske združbe (Muylaert in sod., 2002). Višji vnos hranil v ekosistem ima za posledico povečano rast mikroorganizmov (Madigan in Martinko, 2006). Findlay s sod. (1993) ugotavlja, da je povečana količina raztopljenih organskih snovi v vodi pomemben vir hranil za bakterije v sedimentih in ima za posledico njihovo večjo biomaso. Tako kot pri makrofitih, je tudi pri bakterijah limitirajoč dejavnik koncentracija fosforja v vodi (Muylaert in sod., 2002). Fosfor ima pomembno vlogo v biološkem metabolizmu in je limitirajoč dejavnik biološke produktivnosti v vodi, saj ga je od vseh makronutrientov najmanj (Wetzel, 2001).

#### 3.7.1.6 Substrat in sedimenti

Relativen pomen posamezne izmed štirih omenjenih skupin bakterijskih združb je v vodotokih delno odvisen od razporeditve substrata v strugi. V odvisnosti od podlage v strugi, vodnega toka in količine sedimenta, lahko v substratu prevladujejo drobnozrnati sedimenti ali kamnite površine (Palumbo in sod., 1987). Sedimenti so sestavljeni iz organske snovi, mineralnih delcev in neorganskih delcev biogenega izvora (Wetzel, 2001). Heterogena mešanica delcev različnih velikosti, različne teksture in izvora lahko vpliva na

biomasa in strukturo bakterijske združbe (Santmire in Leff, 2006, cit. po Eisenmann s sod., 1999). Velikost delcev sedimentov vpliva na metabolizem in posledično na rast ter distribucijo mikroorganizmov (Wetzel, 2001). Biomasa bakterij je večja v finih sedimentih kot v grobozrnatih, saj je na voljo večja površina, katero lahko poselijo bakterije (Santmire in Leff, 2007).

### **3.7.2 Biotski dejavniki**

#### **3.7.2.1 Kompeticija in predacija**

Poleg omenjenih dejavnikov na rast posameznih vrst bakterij vpliva tudi kompeticija. Na uspešnost pri kompeticiji med mikroorganizmi vplivajo različni dejavniki, na primer hitrost privzema nutrientov, stopnja metabolne aktivnosti in hitrost rasti (Madigan in Martinko, 2006). Predacija oziroma prehranjevanje protozojev in metazojev z bakterijami znano kot grazing vpliva na strukturo bakterijskih združb in regulira bakterijske populacije (Muylaert in sod., 2002).

## **3.8 VLOGA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB V VODNIH EKOSISTEMIH**

Mikroorganizmi so ključni pri biogeokemičnem kroženju, to je kroženje elementov v naravi. Sodelujejo pri dekompoziciji odmrle organske snovi in imajo pomembno vlogo pri recikliranju različnih elementov v okolju, še posebej ogljika, žvepla, dušika in železa (Madigan in Martinko, 2006). Biokemijske transformacije raztopljene in suspendirane organske snovi s pomočjo bakterij so ključne pri kroženju nutrientov in pretoku energije znotraj vodnih ekosistemov. Od teh metabolnih transformacij sta odvisna delovanje in stabilnost vodnih ekosistemov. Tako se s pomočjo mikroorganizmov snovi razgradijo in pretvorijo v različnih oksidacijskih in redukcijskih procesih. V sedimentih tekočih voda se na primer vršijo procesi amonifikacije, nitrifikacije, denitrifikacije in nitratne redukcije. Bakterijska razgradnja organske snovi v sedimentih je ključna za pretvorbo organskega fosforja v fosfat. Poleg tega mikroorganizmi v sedimentih ustvarijo ustrezen redoks potencial za sproščanje fosfata v vodo (Wetzel, 2001). Mikroorganizmi lahko razgradijo celo nekatere ksenobiotike, kot so na primer pesticidi (Madigan in Martinko, 2006). Heterotrofne bakterije povezujejo organsko snov s protoziji in metazoji na dnu

heterotrofne prehranjevalne verige. Torej bakterije niso le dekompozitorji, ampak je njihova biomasa pomemben vir hrane za višje trofične nivoje v vodotokih (Beier in sod., 2008; Muylaert in sod., 2002).

### 3.9 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE IN ONESNAŽENJE

Organski in neorganski polutanti so hranilni viri za bakterije (Pesce in sod., 2008). Na splošno velja, da se bakterijska biomasa v vodnih ekosistemih pri zvišanem vnosu hranil v ekosistem poveča (Wetzel, 2001). Bakterijske združbe so neposredno odvisne od fizikalno-kemijskih karakteristik vodnega okolja, zato spremembe v vodnem okolju vplivajo tudi na bakterijske združbe (Lawrence in sod., 2004). Pesticidi lahko na primer inducirajo direktne in indirektne spremembe v aktivnosti in sestavi bakterijskih združb (Pesce in sod., 2008). Bakterije lahko vzamemo za indikatorske organizme, saj kažejo spremembe v kompoziciji združb kot posledici antropogenega onesnaženja (Kostanjšek in sod., 2005). Strukturni odzivi bakterijskih združb se pojavijo v nekaj tednih po onesnaženju (Tlili in sod., 2008, cit. po Sabater in sod., 2007).

## 4. MESTO RAZISKAV

### 4.1 LEGA IN GEOGRAFSKE ZNAČILNOSTI OBMOČJA

Grosupeljsko kotlino uvrščamo v Dolenjsko podolje. Dolenjsko podolje leži na stiku panonskega, alpskega in dinarskega sveta. Vleče se v 45 km dolgem in 3 km do 12 km širokem pasu od Ljubljanskega barja in Turjaške pokrajine na zahodu, do Raduljskega hribovja in Novomeške pokrajine na vzhodu. Na severu se dviga v Posavsko hribovje, na jugu pa v planotasto Suho krajino (Perko in Orožen-Adamič, 1998).

Grosupeljska kotlina leži v dinarskem svetu. Tu se ob prevladi dolomita in apnenca uveljavljajo kraške oblike površja. Kotlina je zelo razčlenjena. Obdajajo jo griči in hribi, ki večinoma pripadajo dinarskemu gorstvu, na severu in severozahodu pa alpskemu Posavskemu hribovju (Poženel, 1962). Griči in planote se menjavajo s poplavnimi kotlinami, kraškimi polji in uvalami, ki jih obdajajo in sekajo prelomi dinarske smeri. Povprečna nadmorska višina pokrajine je 320 m (Perko in Orožen-Adamič, 1998). Nizko površje kotline je rezultat delovanja nekdanjega vodotoka Rašice in tektonskega zastajanja med dviganjem obrobja, najverjetneje v mlajšem pliocenu (Poženel, 1962). Na dnu Grosupeljskega polja so trije osnovni reliefni tipi: živoskalni osamelci, napeto dolinsko dno iz kraške rdeče prsti in široka aluvialna ravnica ob vseh vodotokih (Meze in sod., 1980).

Povirje Grosupeljščice je v Posavskem hribovju, ki se zniža v gričevje, katero obdaja osrednji, ravninski del tektonsko zasnovane Grosupeljske kotline. Južno od Grosuplja je stekališče vodnih tokov, kjer se Grosupeljščici pridružijo vodotoki, ki izvirajo na kotlinskem robu, pogosto v obliki kraških izvirov. Eden izmed teh izvirov je tudi izvir potoka Podlomščica. Pred regulacijami vodotokov v šestdesetih in sedemdesetih letih prejšnjega stoletja so področje ogrožale poplave. Zaradi premajhnega strmca večine vodotokov, so bile melioracije uspešne le ob Grosupeljščici (Perko in Orožen-Adamič, 1998). Sestava aluvialne ravnice in majhen strmec onemogočata melioracijo, zato so področja nekdanjih poplav še vedno mokrotna, ponekod celo močvirna (Meze in sod., 1980). Le zadnji del Podlomščice pod vasjo Spodnja Slivnica in Grosupeljščica tik pred



sotočjem imata še naravno strugo v okljukih. Na sotočju obeh potokov se v strugi pokaže matična kamnina iz jurskih apnencev (Peterlin, 2007).

#### 4.2 GEOLOŠKA PODLAGA

Grosupeljska kotlina je skoraj v celoti iz mezozojskih karbonatnih kamnin, med katere se ponekod vpletajo skrilavci in peščenjaki (Meze in sod., 1980). Na območju Grosupeljske pokrajine se stikajo različne tektonske in kamninske enote. Na severnem delu prevladujejo neprepustni dolomiti, na jugu pa jurski in kredni apnenci. Kotlino pokriva debela plast aluvialnih nanosov, iz katere mole le posamezni osamelci. Robni del kotline je iz dolomita. V južnem delu pokrajine prevladujejo apnenci in površje je tu izrazito kraško. Tu leži Radensko polje, eno najmanjših kraških polj v Sloveniji (Perko in Orožen-Adamič, 1998). Pasovi nepropustnih kamenin z normalnim površjem prekinjajo apnenčast in dolomiten svet. Višji predeli so predvsem iz dolomita, ki ga ponekod prekinjajo proge apnenca, skrilavca oziroma peščenca. V širšem obrobju kotline so paleocojske kamenine (Poženel, 1962).

#### 4.3 PEDOLOŠKA SESTAVA

Lastnosti prsti so povezane s kamninami n reliefom ter podnebnimi razmerami. Večino dolomitnega področja pokrivajo pokarbonatne prsti (Perko in Orožen-Adamič, 1998). Aluvialne poplavne ravnice ob vodotokih, ki tečejo po dnu Grosupeljskega polja, pokriva kraška rdeča prst. Največ kraške rdeče prsti se je ohranilo zahodno in južno od Grosuplja, kjer sestavlja razvodje med Grosupeljščico in Podlomščico oziroma Bičjem. Struge vodotokov so izdelane v glini. Na prsti poplavnega sveta na obrobnih delih polja, poleg poplavne vode iz strug vpliva tudi visoka talna voda in deževnica, ki zaradi slabo prepustnih tal odteka zelo počasi. Vse to prispeva k prekomerno navlaženi prsti, kar se odraža v sestavi in vrsti prsti (Meze in sod., 1980). V območjih izpostavljenih talni in poplavni vodi kamninsko osnovo za prsti predstavljajo ilovnato-glinasti nanosi. Prsti, ki so v večjem delu profila stalno nasičene z vodo, so oglejene. Slabo oglejene prsti ob reguliranih vodotokih so vlažne predvsem v zgornjih horizontih (Perko in Orožen-Adamič, 1998). V poplavnih ravninah Grosupeljskega polja tako prevladujejo gleji in obrečne rjave prsti (Poženel, 1962).

#### 4.5 HIDROGEOGRAFIJA

Na področju prevladuje zmernocelinsko vlažno podnebje. Pokrajina je del dinarskega sveta, kjer prevladujeta fluviokraški in kraški relief, rečni relief pa se uveljavlja le krajevno (Perko in Orožen-Adamič, 1998). Vodna mreža je na Grosupeljskem polju kljub karbonatnim kamninam gosta. V severnem dolomitnem predelu je razvito normalno vodovje, ki ima mnoge dotoke v obliki kraških izvirov v dnu doline ali na pobočjih blizu dna. Na jugu skoraj vsi potoki prihajajo na dan v kraških izvirov v apnencu in tečejo po neprepustni glinasti naplavini na dnu Grosupeljskega polja. Vodo po dnu Grosupeljskega polja odvajata potoka Grosupeljščica in Podlomščica (Meze in sod., 1980).

#### 4.6 OPIS VODOTOKOV

##### 4.6.1 Grosupeljščica

Grosupeljščica izvira v Posavskem hribovju kot Veliki potok. Svoje ime dobi šele ob vstopu v Grosuplje, ko se združijo manjši potoki z dolomitnega sveta severovzhodno od Grosuplje (Duplica, Črni potok, Veliki potok, Breg), pod Grosupljem pa se ji pridruži še Gatinski potok. Grosupeljščica teče od Grosupljega po široki akumulacijski dolini, ki južno od mesta preide v široko Grosupeljsko polje (Meze in sod., 1980).

Grosupeljščica je prodonosni vodotok. Med vsemi potoki ima v toku po Grosupeljskem polju največji strmec, ki je mnogo večji v zgornjem in srednjem delu toka. Danja ravnica Grosupeljščice je v severnem delu Grosuplje na 334 m nadmorske višine. Substrat je v zgornjem in srednjem delu struge večinoma prodnat s primesmi peska, peščene ilovice in glin. V spodnjem delu struge je več glinenih sedimentov in peščene ilovice (Meze in sod., 1980).

V zgornjem delu toka makrofiti niso prisotni, v srednjem delu pa se od makrofitov v strugi pojavlja le ena vrsta-*Fontinalis antipyretica*, ki je bolj pogosta v nižinskem delu vodotoka. V zgornjem in srednjem delu vodotoka je zaledje enotno, potok teče skozi mešani gozd. V srednjem delu se ob potoku pojavijo manjše vasi in tu se poleg gozda v zaledju pojavljajo manjši travniki. V spodnjem delu, po zlitju z Duplico, je potok od Jerove vasi naprej v celoti reguliran. Potok teče čez mesto Grosuplje in nato prek kmetijskih površin mimo vasi

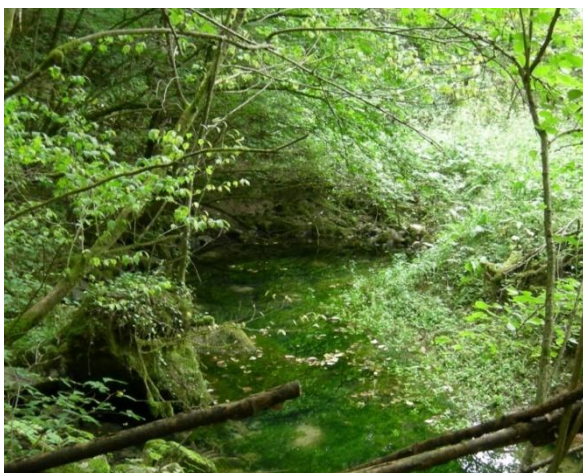
Veliko in Malo Mlačevo, kjer se tik pred Radenskim poljem zlije s Podlomščico. Z intenzivno obdelovanih kmetijskih površin se v spodnjem delu v potok izpirajo gnojila in pesticidi. Tu obrežno vegetacijo sestavljajo predvsem trave, avtohtona lesnata vegetacija je skoraj v celoti odstranjena in blažilni obrežni pas je ozek. Potok zaradi regulacije in melioracije ob obilnih padavinah redko preplavi bregove (Meze in sod., 1980).

#### **4.6.2 Podlomščica**

Podlomščica je najmočnejša kraška reka, ki z juga priteka na Grosupeljsko polje. Ima veliko kraških pritokov, ki izvirajo na robu kotline (Meze in sod., 1980). Podlomščica ima kraški izvir pri zaselku Podlom. Kasneje se okrepi še z vodo iz pritoka Bičje in teče po nanosih južnega dela Grosupeljskega polja (Peterlin, 2007).

Potok ima od izvira do zлива z Grosupeljščico zelo majhen strmec in posledično počasen tok. Danja ravnica Podlomščice se od 330 m nadmorske višine jugozahodno od Spodnje Slivnice zniža na 325 m ob sotočju z Grosupeljščico. Substrat je po celotni dolžini vodotoka pretežno glinen, v spodnjem delu vodotoka se v sedimentih pojavlja tudi mulj (Meze in sod., 1980).

Makrofiti se pojavljajo po celotni dolžini vodotoka. Potok v povirnem delu teče skozi mešan gozd mimo zaselka Podlom, nato pa preko travnikov mimo južnega dela Grosuplja, kjer je v strugo speljan iztok iz komunalne čistilne naprave. Malo pred iztokom se v Podlomščico izliva potok Bičje. Potok nato teče preko travnikov in obdelovanih kmetijskih površin proti Radenskemu polju. Iz gnojenih travnikov ob vodotoku, se v potok izpirajo gnojila. Obrežni pas je na tem odseku ozek, na določenih predelih je lesnata vegetacija večinoma ali v celoti odstranjena. Spodnji del potoka, od mesta, kjer potok priteče iz gozda, do nekaj 100 m za komunalno čistilno napravo, je vodotok reguliran. Kljub regulaciji vodotok zaradi majhnega strmca občasno preplavlja bregove (Meze in sod., 1980).



Slika 1: Izvir vodotoka Podlomščica



Slika 2: Podlomščica za iztokom komunalne čistilne naprave Grosuplje



Slika 3: Zadnji del vodotoka Grosupeljščica

## **5 METODE DELA**

### **5.1 DELO NA TERENU**

Na terenu smo v letih 2007 in 2008 izvedli popis makrofitov, širšo okoljsko oceno po metodi RCE (Petersen, 1992) in oceno habitatnih parametrov (Janauer, 2002). Vzorčenje je potekalo dve leti zaradi neugodnih vremenskih razmer, to je poletje s pogostimi padavinami, ki imajo za posledico dvig vodne gladine in kalnost vode, ki onemogočata tako dostop do vodotoka kot samo opažanje rastlin v njem. Poleg tega tudi metoda RCE in metoda ocene habitata zahtevata optimalne razmere za vrednotenje na podlagi opazovanja, da so rezultati bolj verodostojni oziroma je ocena bolj točna. Na teren gremo zato nekaj dni po obilnejših padavinah, ko vodna gladina upade in voda ni več kalna (Water quality... , 2003). Na terenu smo enkrat v sezoni opravili fizikalne meritve in odvzeli vodne vzorce za kemijske analize. Hkrati smo na istih vzorčnih mestih odvzeli tudi vzorce sedimentov za molekularne analize bakterijskih združb.

#### **5.1.1 Fizikalne in kemijske analize vode in odvzem vzorcev sedimentov**

14.11. 2007 smo na terenu odvzeli vzorce sedimentov za analizo bakterijskih združb in vodne vzorce za analize kemijskih parametrov. Na mestu vzorčenja smo opravili tudi nekatere fizikalne in kemijske meritve. Izbrali smo 11 vzorčnih mest, ki so standardna vzorčna mesta za fizikalno-kemijske analize in odvzem vzorcev Inštituta za fizikalno biologijo (IFB) (Preglednica 1). Z GPS-om smo odčitali geografske koordinate na vsakem vzorčnem mestu. Ker smo sledili standardnim vzorčnim mestom IFB, smo vzorčili tudi na treh mestih na potoku Bičje, ki so pomembna za interpretacijo stanja vodotoka Podlomščica v njegovem spodnjem delu.

##### **5.1.1.1 Fizikalne in kemijske analize vode**

Meritve temperature vode, koncentracije kisika v vodi, nasičenosti vode s kisikom in električne prevodnosti smo izvajali z multimetrom Multi350i (WTW – Wissenschaftlich - Technische Werkstätten GmbH, Nemčija) na mestu vzorčenja.

Preglednica 1: Številka in ime lokacije vzorčnih mest za fizikalne in kemijske analize in odvzem sedimentov (KČN: komunalna čistilna naprava)

Št. lokacije	Ime lokacije
1	Grdi žleb pri Spodnjem Blatu
2	Šica pod Malo Račno, nad Vrbetovim mlinom
3	Grosupeljščica pri lesenem mostu pred Grosupljem
4	Grosupeljščica v Jerovi vasi za mostom
5	Grosupeljščica za Adamičevim mostom
6	Grosupeljščica konec Grosuplja
7	Bičje v Brezju
8	Bičje pred iztokom KČN
9	Bičje na iztoku KČN
10	Podlomščica za KČN pod Slivniškim hribom
11	Podlomščica 2 km dolvodno od KČN

#### 5.1.1.2 Odvzem vodnih vzorcev in vzorcev sedimenta

**Material:** sterilne 150 mL vzorčne posodice (Golias) za hitre kemijske teste, sterilne centrifugirke, hladilna torba z malimi mrazi, sterilne plastične žlice, robci za brisanje sond, vzorčevalna palica, tekočina za sterilizacijo rok, vrečke, alkoholni flomaster, nalepke

**Aparature:** multimeter Multi350i (WTW – Wissenschaftlich - Technische Werkstätten GmbH, Nemčija), GPS (Global Positioning System)

S sterilnimi 150 mL vzorčnimi posodicami smo vzeli vodne vzorce. Posodico smo najprej splaknili z vzorčevano vodo in jo nato previdno do vrha napolnili z vodo tako, da v posodi ni bilo zračnih mehurčkov. Posodo smo zaprli z zamaškom in jo ustrezno označili z vodoodpornim flomastrom (datum, vzorčno mesto). Vse posodice smo dali v plastično vrečko in jo opremili z nalepko, na katero smo prav tako napisali oznako vzorčnega mesta,

datum in ime vodotoka ter vrečko shranili v hladilno torbo. Vodne vzorce smo do analize shranili v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Vzorce sedimentov smo vzeli tako, da smo na vzorčnem mestu s sterilno plastično žlico previdno odvzeli sediment in ga prenesli v sterilno centrifugirko. Na mestih, kjer je bil breg strm in voda globoka, smo sediment odvzeli s pomočjo vzorčevalne palice. Centrifugirko smo zaprli s pokrovčkom ter jo označili in shranili na enak način kot posodice z vodnimi vzorci. Vzorce sedimentov smo nato v laboratoriju centrifugirali 10 min pri 3000obratov/min in jih do nadaljnjih analiz shranili v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **5.1.2 Makrofiti**

V rastnih sezonah 2007 in 2008 smo vzorčili makrofite v vodotokih Podlomščica (2007) in Grosupeljščica (2008). Makrofite vzorčimo v času od pozne pomladi do zgodnje jeseni (Water quality... , 2003). Pri tem smo prehodili celotno dolžino vodotokov in na izbranih 100m odsekih popisali makrofitske vrste in ocenili njihovo pogostost po metodi, ki sta jo opisala Pall in Janauer (1995). Po isti metodologiji smo tudi določili rastne oblike popisanih rastlinskih vrst. Grosupeljščico smo pregledali le na spodnjem odseku vodotoka, to je od zlitja Velikega potoka z Duplico, ko potok tudi dobi svoje ime. Makrofite smo potegnili iz vode s pomočjo palice za vzorčenje makrofitov. Po potrebi smo rastline shranili v plastične posode, v katere smo zajeli malo vode, da so ostale nepoškodovane do določanja. Makrofite smo določili s pomočjo določevalnih ključev (Martinčič in sod., 1999; Holmes, 2005). Mahove smo določili s pomočjo opazovanja pod električno lupo. Posamezne primerke vrst smo herbarizirali.

### **5.1.3 Širša okoljska ocena vodotokov in ocena habitatnih parametrov**

Na istih 100 m odsekih, na katerih smo popisovali makrofite, smo s pomočjo ustreznih obrazcev ovrednotili stanje vodotokov po metodi RCE in ocenili habitatne parametre. Širšo okoljsko oceno smo določali po prirejeni RCE metodi (Germ in sod., 2003; Urbanič in Toman, 2003). Oceno habitata smo naredili po skrajšani slovenski različici metodologije po Janauerju (2002). Odseke smo izbrali smiselno glede na spreminjanje lastnosti vodotoka (morfologija struge, vrstna sestava makrofitov, lastnosti obrežne vegetacije,...) in zaledja

(gozd, urbana območja, kmetijske površine,...). Z GPS-om smo odčitali geografske koordinate na začetku in na koncu vsakega odseka. Izbrane odseke smo označili na zemljevidu.

Pri metodi RCE (River, Channel and Environment Inventory oz. obrežje, struga in okolje) gre za ekomorfološko vrednotenje vodotoka (Petersen, 1992), ki upošteva različne morfološke in biotske parametre, katere primerjamo s potencialnim naravnim stanjem vodotoka. Metoda je bila razvita za vrednotenje majhnih (<3 m široki), nižinskih vodotokov na kmetijskih območjih na osnovi fizičnih in biotskih značilnosti vodotoka, upoštevaje značilnosti njegovega zaledja. Vsak RCE parameter je razdeljen v štiri številčno različno ovrednotene kategorije. Najbolj nespremenjeno-naravno stanje je ovrednoteno z najvišjo vrednostjo, najbolj degradirano stanje pa z najnižjo (Urbanič in Toman, 2003). Na podlagi vsote točk vseh dvanajstih parametrov vodotok umestimo v enega od petih kakovostnih razredov.

Raba zemljišča je narejena po klasifikaciji CORINE (CORINE... , 1985, cit. po Janauer, 2002). Med habitatne parametre spadajo: vodni tok, tip sedimenta, struktura brega, zaledje. Pri oceni habitata je vsak parameter razdeljen v več kategorij, katerim pripada določena številčna koda. Te kode omogočajo lažjo obdelavo podatkov.



## 5.2. DELO V LABORATORIJU

### 5.2.1 Fizikalne in kemijske analize vode

Analize smo opravili dne 22.11.2007 v laboratoriju, s pomočjo kompleta za kemijske analize (Visocolor) po navodilih proizvajalca. Metoda temelji na kolorimetrični reakciji snovi v vzorcu z reagenti. Določili smo pH ter vsebnost nitratnih in fosfatnih ionov v vodnih vzorcih. Pomanjkljivost metode je subjektivnost pri oceni obarvanosti vode z reagentom. Prednost je ta, da so testi poceni in hitri, tako da lahko v razumnem času analiziramo večje število vzorcev.

### 5.2.2 Bakterijske združbe sedimentov

#### 5.2.2.1 Izolacija DNA

DNA smo izolirali po standardnem postopku za izolacijo DNA Inštituta za fizikalno biologijo. Izolacija temelji na fenol-kloroformski ekstrakciji nukleinskih kislin.

#### 5.2.2.2 Čiščenje vzorcev

Vzorci izolirane DNA smo čistili po standardnem postopku Inštituta za fizikalno biologijo. Čiščenje temelji na čiščenju skozi Sephadex kolonice.

#### 5.2.2.3 PCR (Polymerase chain reaction oziroma polimerazna verižna reakcija)

### Merjenje koncentracije DNA

Najprej smo izmerili koncentracije DNA v očiščenih vzorcih. Na podlagi dobljenih koncentracij DNA smo ocenili, kolikšne razredčitve očiščenih DNA vzorcev bomo pripravili za PCR.

**Material:** Quant-It<sup>M</sup> dsDNA HS Assay Kit za določanje koncentracije DNA, male epice, očiščeni DNA vzorci

**Aparature:** fluorometer (Qubit), stresalnik

Koncentracijo DNA smo izmerili po navodilih proizvajalca kita (Quant-It<sup>M</sup> dsDNA HS Assay Kit). Meritve temeljijo na vezavi reagenta na DNA v vzorcu in detekciji emisijskega spektra svetlobe vezanega reagenta s fluorometrom. Iz izmerjene koncentracije DNA smo izračunali koncentracijo DNA v vzorcu po formuli:

$$\text{Koncentracija vzorca} = \text{QF} \cdot (200/x)$$

QF-koncentracija DNA izmerjena s fluorometrom (ng/mL)

x-količina vzorca v kateri smo izmerili koncentracijo DNA ( $\mu\text{L}$ )

## PCR

PCR (Polymerase chain reaction oz. polimerazna verižna reakcija) temelji na termičnih ciklih, pri katerih pride do razklenitve DNA verige in encimske replikacije DNA. DNA polimeraza in primerji, ki vsebujejo sekvenco komplementarno tarčni regiji na DNA, predstavljajo ključne elemente, ki omogočajo selektivno ponavljajočo amplifikacijo (<http://en.wikipedia.org/wiki/PCR>). Primerji se vežejo na tarčno regijo na DNA, polimeraza pa uporabi intaktno verigo DNA kot šablono in z dodajanjem nukleotidov sintetizira komplementarno verigo ([http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_polymerase](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_polymerase)).

Vsak cikel je sestavljen iz 2-3 temperaturnih stopenj (<http://en.wikipedia.org/wiki/PCR>):

1. Denaturacija: Segrevanje reakcije na 94-98°C za 20-30 sekund. Dna veriga se razkrene.
2. Temperatura reakcije se zniža na 50-65°C za 20-30 sekund. Vezava primerjev in polimeraze na DNA.
3. Elongacija: Temperatura reakcije se zviša na 75-80°C. Polimeraza sintetizira komplementarno verigo DNA z dodajanjem nukleotidov.
4. Na koncu se reakcija ustavi in temperatura se zniža na 4-15°C. na ta način lahko kratkoročno hranimo dobljen PCR produkt.

S PCR smo pomnoževali del gena očiščenih DNA vzorcev, ki kodira 16S rRNA fragmente. Ta sekvenca je zelo konzervativna med različnimi vrstami bakterij, zato na podlagi teh sekvenc lahko ločimo taksonomske skupine ([http://en.wikipedia.org/wiki/16S\\_ribosomal\\_RN](http://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RN)). Postopek smo ponavljali pri različnih

razredčitvah prečiščenih vzorcev in različnih reakcijskih mešanicah, dokler nismo dobili optimalnega produkta (čim večja količina in čistost pomnožka). Pri reakcijski mešanici smo spreminjali količino primer-jev in Taq polimeraze. Preizkusili smo tudi reakcijsko mešanico brez in z dodanim govejim serumskim albuminom. Nato smo za vsak vzorec izvedli PCR pri ugotovljeni najustreznejši razredčitvi vzorca in najustreznejši reakcijski mešanici, in sicer smo za vsak očiščen DNA vzorec napravili 3 pomnožitve s PCR, da smo dobili dovolj produkta za TGGE. PCR smo izvedli po spodaj opisanem postopku.

**Material:** ustrezne razredčitve očiščenih DNA vzorcev, 10  $\mu\text{L}$  in 100  $\mu\text{L}$  pipeta (Eppendorf), nastavki za pipete, sterilne epice za PCR, 1,5 mL sterilne epice (Eppendorf), termo-blok (za reagente in PCR epice), razkužilno sredstvo za roke

**Reakcijska mešanica (za 1 vzorec):**

Mili-q (bidestilirana sterilna voda): 17,25  $\mu\text{L}$   
pufer AB: 2,5  $\mu\text{L}$   
 $\text{MgCl}_2$ : 1,5  $\mu\text{L}$   
BSA (gojeji serumski albumin): 0,2  $\mu\text{L}$   
U 968gc primer: 1  $\mu\text{L}$   
1401 primer: 1  $\mu\text{L}$   
dNTP (nukleotidi): 0,25  $\mu\text{L}$   
taq-polimeraza: 0,3  $\mu\text{L}$

**Aparature:** UV komora (UVC/T-M-AR), PCR (Biometra), plinski gorilnik

1. Pred pričetkom preračunamo količine posameznih snovi reakcijske mešanice glede na število vzorcev, za katere bomo izvajali PCR, pri čemer upoštevamo tudi negativno kontrolo.
2. V termo-blok iz zamrzovalnika si pripravimo potrebne reagente oz. snovi za PCR mešanico: mili-q, pufer AB,  $\text{MgCl}_2$ , BSA, primer U968gc, primer 1401, dNTP.
3. V UV komoro damo par rokavic, mili-q, pufer AB,  $\text{MgCl}_2$  in za 15 minut prižgemo UV luč. Drugi par rokavic imamo zraven komore.
4. Tik pred pričetkom dela umijemo roke do komolcev in jih razkužimo z razkužilnim sredstvom za roke.

5. Delamo v sterilni UV komori. Najprej si pripravimo eno 1,5 mL epico za PCR mešanico in PCR epice za posamezne vzorce. Epice ustrezno označimo s flomastrom.
6. V epico za PCR mešanico odpipetiramo preračunane količine reagentov: mili-q, pufer AB, MgCl<sub>2</sub>, BSA, primer U968gc, primer 1401, dNTP. Preden odpipetiramo vsebino, vsako epico rahlo frcnemo s prstom, da zmešamo vsebino. Reagente odlagamo v termoblok.
7. Taq polimerazo dodamo nazadnje. Vzamemo jo iz zamrzovalnika z drugim parom rokavic. Tako zmanjšamo možnost za kontaminacijo. Taq polimerazo vrnemo v zamrzovalnik takoj, ko jo odpipetiramo!
8. S pipeto pomešamo PCR mešanico in nato v vsako PCR epico odpipetiramo 24 µL mešanice. Epice odlagamo v termo-blok. V epico z negativno kontrolo dodamo 1 µL mili-q.
9. Termo-blok z epicami odnesemo k plinskemu gorilniku in s pipeto dodamo po 1 µL DNA vzorca v ustrezno označeno epico.
10. Epice damo v PCR in ga zaženemo. Temperaturni pogoji: 92°C-3 min (iniciacija), nato sledi 34 ciklov: 92°C-30 s (denaturacija), 54°C-30 s (vezava primer-jev), 77°C-1 min (elongacija), 72°C-7 min (na koncu zadnjega cikla).
11. Pospravimo PCR komoro in za 15 minut prižgemo UV luč.

### **Gelska elektroforeza**

Po končanem PCR smo preverili PCR produkt z gelsko elektroforezo.

**Material za pripravo gela:** agarosa, TBE pufer (tris/borat/EDTA), destilirana voda, merilni valj, erlenmajerica, banjica za gel, glavniček za gel, alu-folija

**Aparature:** mikrovalovka (Gorenje), tehtnica (Biometra)

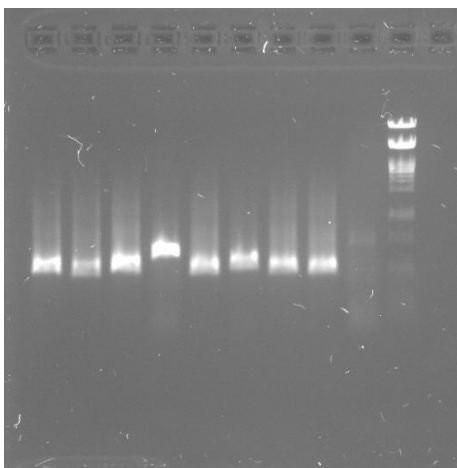
V erlenmajerico smo zatehtali 0,5 g agaroze in dolili 50 mL TBE. Nato smo dolili destilirano vodo do približno 75 mL in mešanico za 2 minuti dali v mikrovalovko na visoko stopnjo segrevanja. Gel smo vzeli iz mikrovalovke in ga pustili, da se malo ohladi.

Nato smo ga razlili v banjico za gel v katero smo predhodno namestili glavničke. Banjico smo prekrili s folijo in pustili, da se gel strdi.

**Material za elektroforezo:** SYBR green (barvilo), Loading dye (barvilo), vzorci PCR produktov,  $\lambda$  Pst (marker), 10  $\mu$ L pipeta (Eppendorf), nastavki za pipeto, plošča z jamicami, gel za elektroforezo, alu-folija

**Aparature:** aparatura za gelsko elektroforezo (BIO-RAD, MINI-SUB CELL/GT), transiluminator (Biometra), plinski gorilnik

V posamezno jamico v plošči smo odpipetirali: 2  $\mu$ L SYBR green, 1  $\mu$ L Loading dye in 2  $\mu$ L PCR produkta. V zadnjo jamico smo odpipetirali 2  $\mu$ L SYBR green in 5  $\mu$ L  $\lambda$  Pst. To je bil naš marker. Vsebino vsake jamice smo pomešali s pomočjo pipete. Delali smo ob gorilniku in za vsak vzorec zamenjali nastavek za pipeto. Nazadnje smo dodali SYBR green, ker na svetlobi razpada. Gel smo namestili v banjico aparature za gelsko elektroforezo in dolili TBE pufer, da je prekril jamice v gelu. V jamice gela smo s pipeto nanесли po 5  $\mu$ L pripravljene mešanice. Na koncu smo nanесли negativno kontrolo in marker. Po vsakem nanosu smo nastavek za pipeto sprali v TBE pufu. Banjico smo pokrili s pokrovom in ustrezno povezali elektrode pokrova z aparaturo za gelsko elektroforezo. Na aparaturi smo nastavili 110 V in jo vklopili. Pokrov banjice smo pokrili z alu-folijo in pustili, da je elektroforeza tekla 10 minut. Po 10 minutah smo gel prenesli v transiluminator, ki je povezan z računalnikom in pod UV svetlobo preverili potovanje bandov. Ali se je PCR produkt pomnožil smo ugotovili tako, da smo potovanje banda vzorca primerjali s potovanjem negativne kontrole. Velikost potujočega fragmenta smo ocenili tako, da smo ga primerjali z markerjem. Slike gelov smo shranili v računalniku.



Slika 4: PCR 30.1.2009 (vzorci od leve proti desni: 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, negativna kontrola, marker)

#### 5.2.2.4 TGGE (toplotno gradientna gelska elektroforeza)

##### **Priprava gela za TGGE**

**Material:** vodna kopel, merilni valj, stekleni plošči za elektroforezo, čaša za TGGE, injekcija (velika), filter (STAR STEDT 0,20  $\mu\text{m}$ ), 1000  $\mu\text{L}$  pipeti (Eppendorf), nastavki za pipeto, elastičen trak, kovinske ščipalke, papirnate brisače, plastične rokavice, polyband, alu-folija, prozorna folija, selotejp

**Reagenti:** urea, TEMED raztopina (tetrametiletilenediamin), mešanica akrilamid/bisakrilamid, formamid, TAE pufer (tris/acetat/EDTA), APS pufer, 40% glicerol, Acryl-Glide, destilirana voda

**Aparature:** magnetno mešalo

Delo poteka v digestoriju!

1. V merilni valj zatehtamo 28,8 g uree. Z malo destilirane vode splaknemo stene valja.
2. Dodamo 1,5 mL TAE pufera (50x razredčen) in 3 mL 40% glicerola.
3. Dodamo 15 mL mešanice akrilamida in bisakrilamida. Vrat steklenice obrišemo s papirnato brisačo in jo vržemo stran!
4. Dodamo 12 mL formamida in valj pokrijemo z alu-folijo, ker formamid hlapi. Vrat steklenice obrišemo s papirnato brisačo in jo vržemo stran!

5. Mešanico segrevamo na vodni kopeli na cca. 60°C. Ko se sestavine raztopijo, damo gel na magnetno mešalo.
6. Stekleno ploščo za elektroforezo z distančniki s pomočjo papirnate brisače pomazemo z Acryl-glide. Premažemo celotno površino stekla, razen spodnjega roba. Počakamo, da se posuši in ga nato z brisačo zberemo.
7. Na ravno steklo za elektroforezo (steklo brez spacer-jev) kanemo malo destilirane vode in prilepimo polyband. S selotejpom po celotni dolžini robov prilepimo polyband na steklo.
8. Na obod stekla s spacer-ji namestimo elastičen trak, tik ob spacer-je.
9. Ravno steklo položimo na steklo s spacer-ji tako, da je polyband med steklenima ploščama in so spacer-ji na notranji strani.
10. Steklene plošči spnemo s kovinskimi ščipalkam. Na spodnji rob damo 4, na stranska robova pa po 3 ščipalke.
11. Plošči postavimo vertikalno tako, da so jamice za vzorce na vrhu gela.
12. Pripravimo si veliko injekcijo in filter za injekcijsko brizgo.
13. V čašo ta TGGE zlijemo gel (z mešalom vred). Odpremo in odložimo filter. Pripravimo pipeti za 102  $\mu\text{L}$  in 180  $\mu\text{L}$ . Sledi hitro delo!
14. V čašo za TGGE odpipetiramo 102  $\mu\text{L}$  TEMED raztopine in 180  $\mu\text{L}$  APS. Nastavek za pipeto po uporabi takoj zavržemo!
15. Celotno vsebino čaše posrkamo v injekcijsko brizgo. Nato natakemo filter in iz brizge brizgnemo malo gela nazaj v čašo.
16. Gel nabrizgamo med stekleni plošči do malo pod vrhnjim robom plošč.
17. Filter zavržemo! Ostanek gela damo nazaj v čašo za TGGE. Na ta način preverimo ali se gel res strjuje. Brizgo splaknemo pod tekočo vodo in jo zavržemo. Rokavice zavržemo!
18. Okoli plošč previdno ovijemo mokre papirnate brisače in vse skupaj zavijemo v prozorno folijo. Tako pripravljen gel lahko hranimo do 3 dni.

### **TGGE perpendicular**

TGGE je okrajšava za toplotno gradientno gelsko elektroforezo. TGGE perpendicular pomeni, da vzorci potujejo pravokotno na smer temperaturnega gradienta. Potovanje vzorcev se ustavi pri temperaturi, pri kateri se DNA vijačnica razklene. Na gelu nastane sigmoidna krivulja. Tako določimo, v katerem temperaturnem intervalu se vijačnice razklenijo in ta interval uporabimo pri nadaljnji analizi. TGGE perpendicular smo izvedli po spodaj opisanem postopku.

**Material:** PCR produkti vsaj 3 vzorcev, črna škatla, 100  $\mu$ L pipeta (Eppendorf), nastavki za pipeto, epica, prekrivna folija, 4 krpice za pomivanje posode, selotejp, papirnate brisače

**Reagenti:** detergent TRITON, 1,25x TAE pufer, bidestilirana sterilna voda (mili-q), destilirana voda, SYBR green, barvilo za elektroforezo

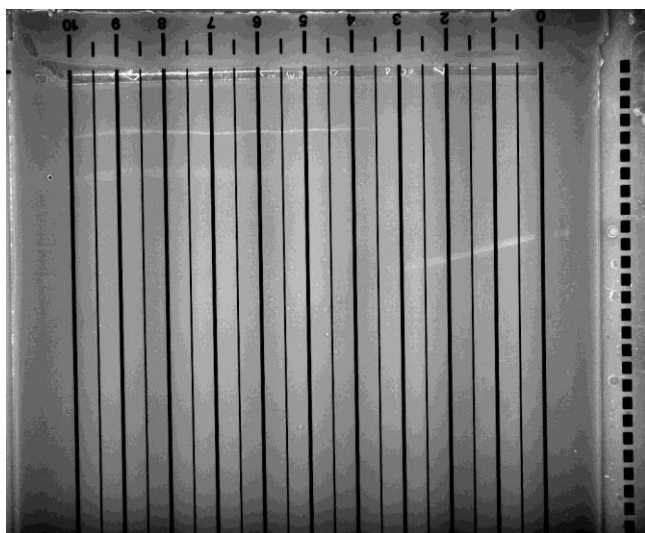
**Aparature:** aparatura za TGGE (Biometra), transiluminator (Biometra)

1. 1,25x TAE pufer nalijemo v obe banjici aparature za TGGE. Na aparaturi izberemo program TGGE perpendicular. Izberemo temperaturni gradient 30-70°C in nastavimo na 300 V za 4 ure.
2. Gel vzamemo izmed steklenih plošč.
3. Na steklo nakapljamo detergent TRITON in po celotni površini prilepimo gel, pravokotno na temperaturni gradient. Pazimo, da med gelom in površino ni zračnih mehurčkov.
4. S papirnato brisačo obrišemo robove in jih po celotni dolžini zalepimo s selotejpom.
5. Gel do jamice za vzorce pokrijemo s prekrivno folijo, da se ne izsuši.
6. V TAE pufer namočimo 4 krpice za pomivanje posode in po dve položimo na vrh in na dno gela.
7. V epico odpipetiramo 40-50  $\mu$ l barvila za elektroforezo in dodamo vse PCR produkte različnih vzorcev (skupaj imamo v epici 200  $\mu$ L). Pomešamo s pomočjo pipete.



8. Odstranimo krpice za pomivanje posode in rob popivnamo s papirnato brisačo. Nato s pipeto enakomerno naneseemo pripravljen vzorec v jamico v gelu. Zopet nazaj namestimo krpice za pomivanje posode.
9. Banjico pokrijemo z malim in velikim pokrovom. Vklopimo aparaturo za 10 minut z napetostjo 300 V, da se vzorec vsrka v gel, nato elektroforeza teče 3 minute brez napetosti, da se vzpostavi temperaturni gradient in nazadnje teče 4 ure z napetostjo 300 V in z vzpostavljenim temperaturnim gradientom.

Po končani TGGE smo gel barvali v črni škatli. 10  $\mu$ L barvila Cyber green smo odpipetirali v 100 mL mili-q. Mešanico smo zlili v črno škatlo in vanjo prenesli gel. Nato smo škatlo previdno zibali 30 minut, da se je gel zalival z barvilom. Nato smo z gela sprali Cyber green z destilirano vodo in gel dali v transiluminator. S pomočjo UV svetlobe in računalniškega programa BioDocAnalyze smo pogledali gel. Sliko gela smo shranili v računalniku.



Slika 5: TGGE perpendicular 21.1.2009 (300 V, 4h, 30-70°C)

## TGGE

Najprej smo koncentrirali naše vzorce (to so PCR produkti) po spodaj opisanem postopku.

**Material:** vzorci PCR produktov, 100  $\mu$ L pipeta (Eppendorf), nastavki za pipeto, stojalo z luknjicami in membrano

**Reagenti:** Loading dye (barvilo),  $\lambda$  Pst (marker), bidestilirana sterilna voda (mili-q)

**Aparature:** stresalnik, vakuumska črpalka (INGENY)

1. V stojalu z luknjicami naredimo vakuum tam, kamor bomo nanašali vzorce.
2. V vsako jamico s odpipetiramo vse PCR produkte enega vzorca. Prižgemo vakuumsko črpalko, da se vzorci prefiltrirajo.
3. V vsako jamico odpipetiramo po 60  $\mu$ L mili-q in zopet prižgemo vakuumsko črpalko, da se vzorci prefiltrirajo.
4. V vsako jamico odpipetiramo po 15  $\mu$ L mili-q in damo stojalo za 15 minut na stresalnik.
5. zabeležimo si dobljeno količino prefiltriranega vzorca.

Najprej smo pripravili gel za TGGE po zgornjih navodilih (priprava gela za TGGE). V jamice gela smo nanegli posamezne pripravljene vzorce. V nekaj jamic smo dali  $\lambda$  Pst, v ostale Loading dye. Zabeležili smo si zaporedje nanesenih vzorcev. TGGE je tekla 4 ure pri napetosti 220 V in v temperaturnem intervalu 40-46°C. TGGE je potekala enako kot TGGE perpendicular. Razlika je v tem, da pri TGGE vzorci potujejo v smeri temperaturnega gradienta. Poleg tega imamo pri TGGE več jamic, v katere nanašamo posamezne vzorce, pri TGGE perpendicular pa imamo le eno večjo jamico, kamor nanesemo vse vzorce. Po končani TGGE smo gel barvali v črni škatli in pogledali v transiluminatorju kot pri TGGE perpendicular.

### **Izrezovanje bandov in izluževanje DNA**

**Material:** TGGE gel, skalpel, 80% etanol za obžiganje, 1,5 mL epice, stojalo za epice, flomaster, plastične rokavice

**Aparature:** plinski gorilnik

Natisnili smo fotografijo gela in s flomastrom označili poudarjene bande na sliki. Sliko smo imeli za pomoč pri izrezovanju bandov iz gela. S skalpelom smo izrezali označene bande iz gela in jih shranili v ustrezno označene epice. Delali smo sterilno ob gorilniku! V epice smo odpipetirali po 30  $\mu\text{L}$  mili-q in jih čez noč postavili v hladilnik, da se je izluževala DNA. Naslednji dan smo odpipetirali mili-q v nove ustrezno označene epice in jih shranili v zamrzovalniku na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Te vzorce smo uporabili pri nadaljnjih analizah.

#### 5.2.2.5 PCR (reamplifikacija bandov)

**Material:** 50x razredčitve TGGE vzorcev, 10  $\mu\text{L}$  in 100  $\mu\text{L}$  pipeta (Eppendorf), nastavki za pipeto, sterilne epice za PCR, 1,5 mL sterilne epice (Eppendorf), termo-blok (za reagente in PCR epice), plastične rokavice, razkužilno sredstvo za roke

#### **Reakcijska mešanica (za 1 vzorec):**

Mili-q voda (bidestilirana sterilna voda): 17,45  $\mu\text{L}$   
pufer AB: 2,5  $\mu\text{L}$   
 $\text{MgCl}_2$ : 1,5  $\mu\text{L}$   
U 968 primer (brez gc repa!): 1  $\mu\text{L}$   
1401 primer: 1  $\mu\text{L}$   
dNTP: 0,25  $\mu\text{L}$   
taq-polimeraza: 0,3  $\mu\text{L}$

**Aparature:** UV komora (UVC/T-M-AR), PCR (Biometra), plinski gorilnik,

Izvedli smo PCR za vse TGGE vzorce, torej za vse izrezane bande. PCR in preverjanje PCR produkta z gelsko elektroforezo sta potekala enako kot v primeru pomnoževanja očiščenih vzorcev DNA, razlika je bila le v reakcijski mešanici. Pri reamplifikaciji v

mešanico nismo dodali govejega albuminskega seruma in uporabili smo primer U968 namesto U968gc.

Vse vzorce smo s PCR pomnožili dvakrat in PCR pomnožke istega vzorca združili tako, da smo ju odpipetirali v ustrezno označeno 1,5 mL epico. Vzorce smo nato poslali na sekveniranje v ustanovo Macrogen v Koreji. Za sekveniranje so primerni le vzorci, katerih bandi so po gelski elektroforezi dovolj poudarjeni, kar pomeni, da je namnožena zadostna količina DNA, da se sekveniranje lahko izvaja. Od 24 izrezanih bandov jih je bilo tako po reamplifikaciji le 8 primernih za sekveniranje.

Izraz DNA sekveniranje se nanaša na različne metode s katerimi se določi zaporedje nukleotidnih baz: adenina, gvanina, timina in citozina, v DNA molekuli. Najpogostejši način sekveniranja poteka kot PCR, samo da so poleg navadnih nukleotidov v reakcijski mešanici tudi terminacijski nukleotidi označeni z radioaktivnimi barvili, ki ustavijo pomnoževanje na mestu, kjer se naključno ustavijo v nastajajočo DNA verigo. Tako dobimo mnogo različno dolgih fragmentov z različnimi terminalnimi nukleotidi. Ko te fragmente damo na elektroforezo, se ločijo po velikosti in točno vemo, kateri nukleotid je na koncu vsakega fragmenta, saj je vsak izmed štirih terminacijskih nukleotidov označen z drugačnim fluorescentnim barvilom. Ker je teh fragmentov ogromno, dobimo celotno zaporedje nukleotidov, torej sekvenco izvirne verige ([http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_sequencing](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing)).

## 5.3 OBDELAVA PODATKOV

### 5.3.1 Fizikalne in kemijske analize vode

Rezultate fizikalnih in kemijskih analiz smo predstavili grafično s pomočjo programa MS Excell.

### 5.3.2 Makrofiti

#### 5.3.2.1 Pojavljanje in pogostost makrofitov

Vsaki popisani rastlinski vrsti smo določili rastno obliko: ap = plavajoče neukoreninjene rastline, sp = potopljene neukoreninjene rastline, fl = plavajoče ukoreninjene rastline, sa = potopljene ukoreninjene rastline, am = rastline z amfibijskim značajem, he = močvirske rastline ali helofiti (Janauer, 2002).

Na vsakem odseku smo ocenili pogostost makrofitskih vrst po petstopenjski lestvici (preglednica št. 1) (Pall, Janauer, 1995). Pogostost oziroma količino vrste interpretiramo kot masni indeks (x), ki je z dejansko biomaso povezan s funkcijo:  $f(x) = x^3$  (Pall in Janauer, 1995). Podatke smo predstavili s preglednicami narejenimi s pomočjo programa MS Excell.

Preglednica 2: Petstopenjska lestvica za oceno pogostosti vrste in povezanost masnega indeksa z dejansko biomaso (povzeto po Pall in Janauer, 1995)

ocena pogostosti vrste	masni indeks (MI) x	dejanska biomasa (PM) $f(x) = x^3$
posamična vrsta	1	1
redka vrsta	2	8
pogosta vrsta	3	27
množična vrsta	4	64
prevladujoča vrsta	5	125

Za računanje kvantitativne pomembnosti vrste v posameznem odseku vodotoka uporabljamo relativno rastlinsko maso (RPM):

$$RPM_x [\%] = \frac{\sum_{i=1}^n (PM_{xi} \cdot L_i) \cdot 100}{\sum_{j=1}^k (\sum_{i=1}^n PM_{ji} \cdot L_i)}$$

$RPM_x$  = relativna rastlinska masa

$PM_x$  = rastlinska masa vrste x v vzorčenju i

$L_i$  = dolžina pregledanega odseka

i = posamezni odsek

j = posamezna vrsta

Vrste so vzdolž vodotoka razporejene relativno homogeno ali pa nezvezno gručasto. Bolj natančno razlago razporeditve vrst nam poda povprečni masni indeks (MMI) in sicer ločimo: MMT-povprečni masni indeks vrste v vseh odsekih vodotoka

MMO-povprečni masni indeks vrste v odsekih, v katerih se ta vrsta pojavlja

$$MMT = \sqrt[3]{\frac{\sum_{i=1}^n MI_i^3 \cdot AL_i}{GL}}$$

$$MMO = \sqrt[3]{\frac{\sum_{i=x}^n MI_i^3 \cdot AL_i}{\sum_{i=x}^n AL_i}}$$

$MI_i$  = masni indeks vrste v odseku i

$AL_i$  = dolžina odseka i, v katerem je vrsta prisotna

GL = celotna dolžina pregledanega vodotoka

Visoka vrednost MMT pomeni, da je določena vrsta številčna in prisotna v velikem delu struge. Višji kot je MMO glede na MMT, bolj se kaže nezvezna gručasta razporeditev vrste in višja je povprečna masa vrste v odseku, v katerem se ta vrsta pojavlja. Večja kot je razlika med MMO in MMT, manjše je število odsekov, v katerih se vrsta pojavlja. Razmerje med omenjenima masnima indeksoma nam poda delež pregledane dolžine struge, v kateri je bila vrsta prisotna (d):

$$d = \frac{MMT^3}{MMO^3}$$

d = 0,5 pomeni, daje bila vrsta prisotna v polovici dolžine pregledane struge

d = 1 pomeni, da je bila vrsta prisotna v celotni dolžini pregledane struge

Obdelavo podatkov o prisotnosti in pogostosti makrofitov na izbranih odsekih smo naredili s pomočjo računalniškega programa, ki ga je po metodologiji Pall in Janauer (1995) priredil Milijan Šiško.

### 5.3.2.2 Kanonična korespondenčna analiza (CCA)

Kanonična korespondenčna analiza nam prikaže povezavo med okoljskimi parametri in pojavljanjem ter razporeditvijo vrst. Pri tem je predpostavljeno, da prisotnost in številčnost vrst vzdolž določenega okoljskega gradienta sledi Shelfordovemu zakonu tolerance. Ta pravi, da vsaka vrsta najbolje uspeva pri določeni vrednosti spremenljivke, in ne more preživeti, če so vrednosti spremenljivke previsoke ali prenizke (Ter Braak in Verdonschot, 1995).

S kanonično korespondenčno analizo smo ugotavljali, kakšne so korelacije med okoljskimi dejavniki in vrstno sestavo makrofitov, med odseki vodotokov in makrofiti ter med okoljskimi dejavniki in odseki vodotokov. Rezultati so prikazani z ordinacijskim diagramom, kjer je velikost vpliva določenega okoljskega dejavnika ponazorjena z dolžino vektorja. Določeni dejavnik najbolj vpliva na tiste taksone, ki se nahajajo vzdolž vektorja, ki ta dejavnik ponazarja. Z metodo izbiranja (forward selection), ki je del programa CANOCO 4.5 (Software for Canonical Community Ordination verzija 4.5) (Ter Braak, 1987), smo izbrali le okoljske spremenljivke, ki statistično značilno vplivajo na različnost nič različnih makrofitskih vrst.

### 5.3.3 Širša okoljska ocena vodotokov

Točkovno vrednotenje in popis okoljskih dejavnikov po RCE metodologiji smo prikazali grafično, s pomočjo programa MS Excel. Stolpci na grafih prikazujejo število točk, ki jih doseže posamezen odsek vodotoka.

### 5.3.4 Ocena habitatnih parametrov

Podatke smo predstavili grafično s pomočjo programa MS Excell. Pojavljanje določenega parametra je prikazano v deležih, pri čemer smo upoštevali dolžine posameznih odsekov, tako da so deleži predstavljeni glede na dejansko dolžino pregledanega dela vodotoka.

### 5.3.5 Bakterijske združbe sedimentov

Za obdelavo rezultatov sekveniranja smo uporabili različne računalniške programe. Najprej smo datoteko dobljene sekvence (Macrogen) za določen vzorec prenesli v program FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). S pomočjo tega programa smo pogledali sekvenco v obliki kromatograma. Kromatogram poda informacijo o zanesljivosti sekvence. Stolpec nad nukleotidno oznako pove, s kolikšno verjetnostjo je določen nukleotid prisoten na določenem mestu v sekvenci. Označili smo najzanesljivejši del sekvence, ga kopirali in obdelali v RDP in z BLAST-om.

V RDP (Ribosomal Database Project) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) smo primerjali svojo sekvenco iz FinchTV s sekvencami v bazi podatkov. Kot rezultat smo dobili dvajset taksonov, ki so po kriterijih RDP najbolj podobni naši sekvenci. Na spletni strani NCBI (National center for biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) smo s pomočjo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) primerjali svojo sekvenco iz FinchTV s sekvencami v bazi podatkov. Kot pri obdelavi podatkov v RDP smo tudi v tem primeru za rezultat dobili taksone, podane z določeno verjetnostjo.

Ko smo tako analizirali vse sekvence, smo s pomočjo programa MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>) izrisali še filogenetsko drevo. Datoteko določene sekvence smo pretvorili v FASTA format. Nato smo s pomočjo RDP poiskali 5 sekvenc, najbolj sorodnih naši izbrani sekvenci. Poleg tega smo izbrali še eno sekvenco, ki ni sorodna izbrani sekvenci, tako imenovan "bacterial outgroup". Dobljene sekvence smo nato prenesli v program Clustal.exe.. S pomočjo tega programa smo poravnali sekvence glede na ujemanje nukleotidov. Dobljene podatke smo nato obdelali s programom BIOEDIT, kjer smo izrezali neujemajoče se dele sekvenc. Nazadnje smo fasta format datoteke s

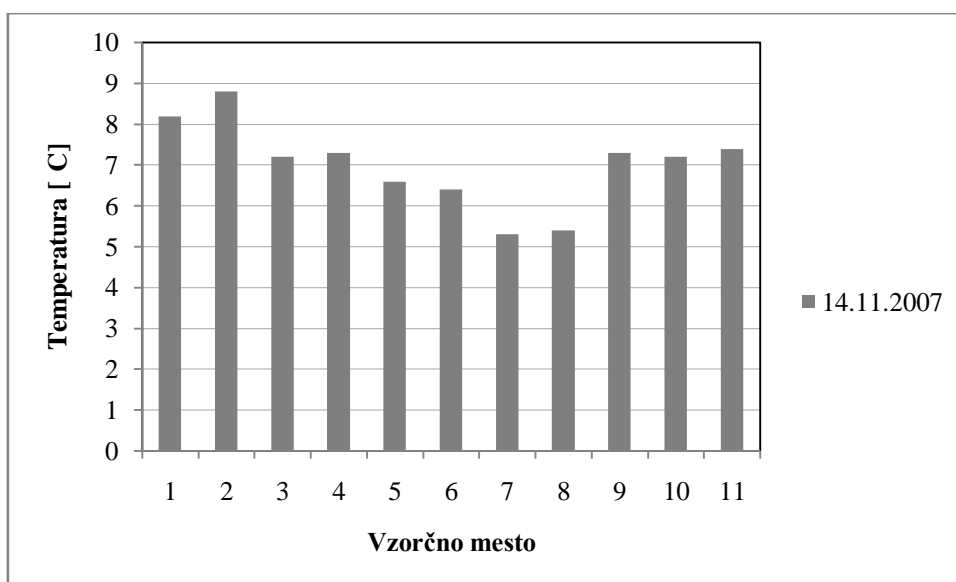


poravnanimi in obdelanimi sekvencami prenesli v mega format in tega odprli v programu MEGA4. Ta program naredi razpredelnico ujemanja sekvenc glede na nukleotide in iz tega izriše drevo sorodnosti oziroma filogenetsko drevo.

## 6 REZULTATI

### 6.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE VODE

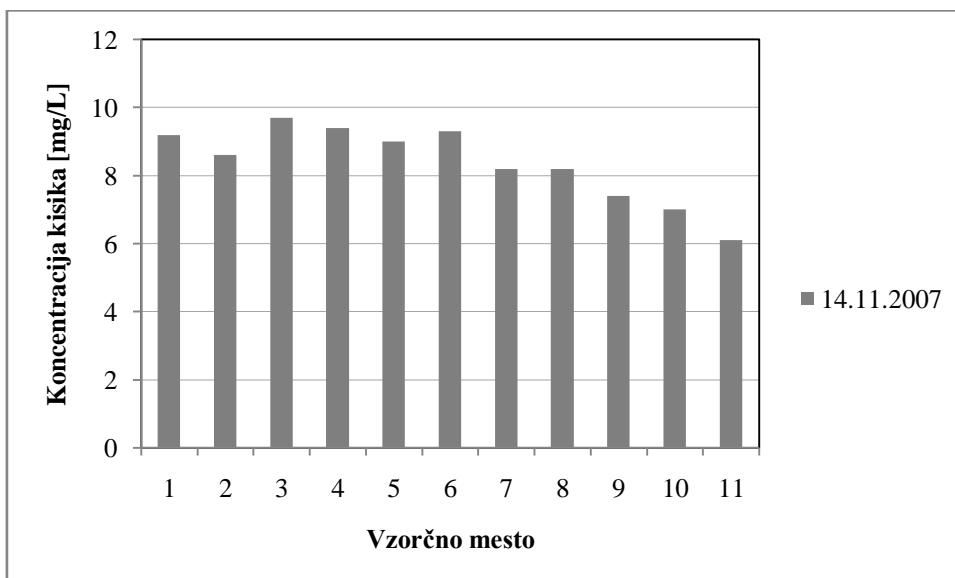
#### 6.1.1 Temperatura vode



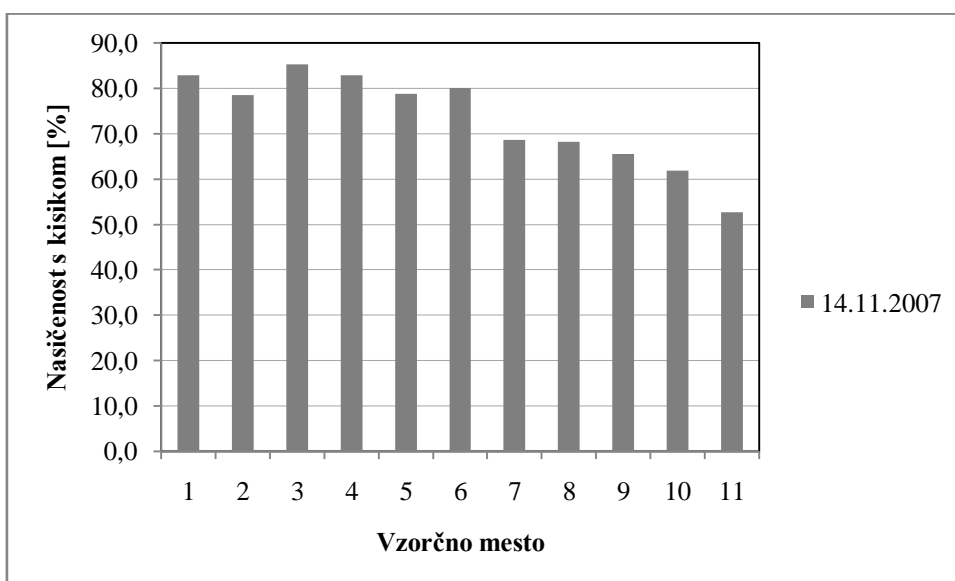
Slika 6: Temperatura vode preučevanih vodotokov 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica)

Meritve smo opravili v jesenskem času. Vreme je bilo mrzlo in oblačno, nekaj dni pred meritvami je bilo vreme sončno in suho. Meritve smo opravljali v dopoldanskem času. Izmerjene temperature vode so bile od 5,3°C do 8,8°C. Temperatura vode je bila najvišja na referenčni točki Šica pod Malo Račno, kjer je dosegala 8,8°C. Najnižjo temperaturo smo izmerili na vzorčnih mestih št. 7 in 8 na potoku Bičje. Na zadnjih treh vzorčnih mestih, to je od iztoka komunalne čistilne naprave dolvodno, je bila temperatura vode za približno 2°C višja kot na predhodnjih dveh vzorčnih mestih. Temperatura vode Grosupeljščice je bila na vzorčnih mestih 3 in 4 enaka kot na mestih 9 in 10, na mestih 5 in 6 pa je bila nekoliko nižja. Razlogi za razlike v izmerjenih temperaturah so lahko različno senčenje vodotoka zaradi obrežne vegetacije ter razlike v globini vode in hitrosti toka.

### 6.1.2 Koncentracija kisika in nasičenost s kisikom



Slika 7: Koncentracija kisika v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica)



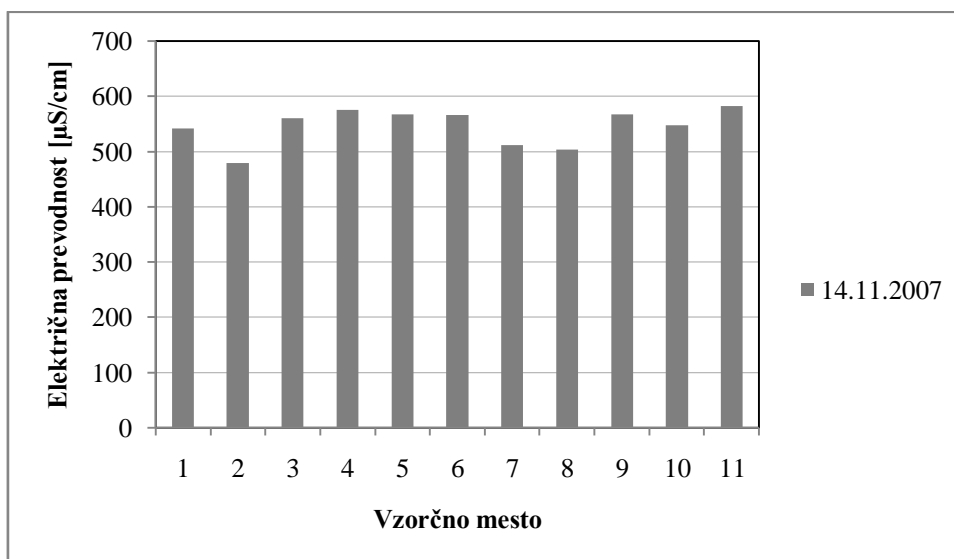
Slika 8: Nasičenost vode s kisikom v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica)

Izmerjene vrednosti koncentracije kisika v vodi so bile od 6,1 mg/L do 9,7 mg/L (Slika 7). Koncentracije so bile višje na referenčnih točkah in v Grosupeljščici, kjer je vodni tok hitrejši. Najvišja koncentracija je bila izmerjena v Grosupeljščici na vzorčnem mestu 3. Nekoliko nižje so bile koncentracije kisika na vzorčnih mestih 7 in 8 v potoku Bičje, nato

pa je koncentracija kisika na zadnjih treh vzorčnih mestih padala. Nižje koncentracije so lahko posledica iztoka komunalne čistilne naprave, saj se koncentracija kisika zniža od iztoka dolvodno, na nižje koncentracije pa vpliva tudi počasnejši tok Podlomščice.

Izmerjene vrednosti nasičenosti vode s kisikom so bile od 53% do 85% (Slika 8). Trend vrednosti sledi izmerjenim koncentracijam kisika v vodi. Najnižja koncentracija je bila izmerjena na zadnjem vzorčnem mestu, to je Podlomščica 2 km dolvodno od komunalne čistilne naprave. Tudi tu so najvišje izmerjene vrednosti v potoku Grosupeljščica, ki ima hitrejši vodni tok in pretežno prodnat substrat.

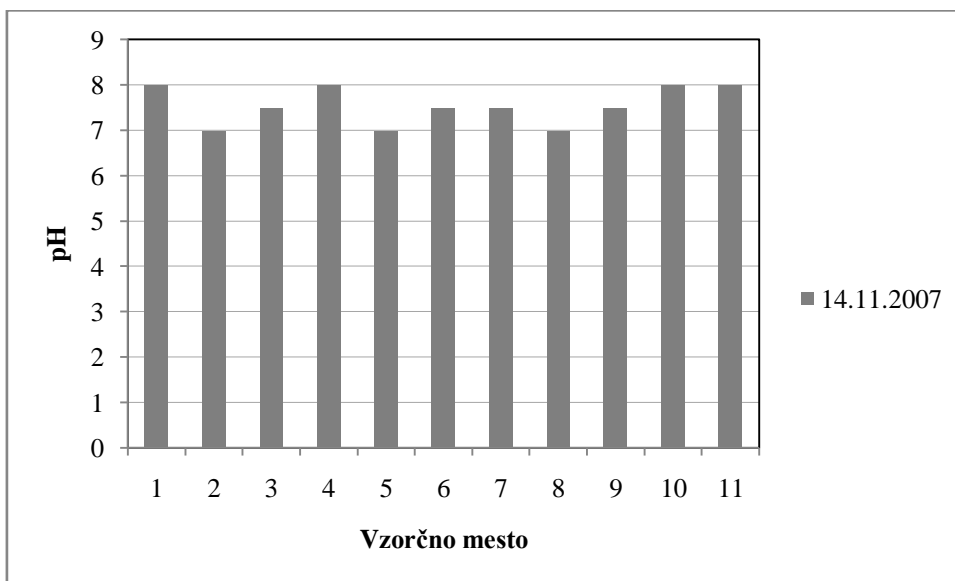
### 6.1.3 Električna prevodnost



Slika 9: Električna prevodnostv preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica)

Izmerjene vrednosti za električno prevodnost vode so bile od 480  $\mu\text{S}/\text{cm}$  do 583  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Najnižjo vrednost smo izmerili na drugi referenčni točki, najvišjo pa na zadnjem vzorčnem mestu v Podlomščici. V Grosupeljščici smo izmerili zelo podobne vrednosti na vseh vzorčnih mestih (vzorčna mesta od 3 do 6) in sicer od 561  $\mu\text{S}/\text{cm}$  do 576  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Na vzorčnih mestih 7 in 8 so bile vrednosti nekoliko nižje, na zadnjih treh mestih pa zopet podobne kot v Grosupeljščici. Razlog za podobne rezultate je najverjetneje v podobnem zaledju, saj vodotoke ob vzorčnih mestih obdajajo urbana območja ali gnojeni travniki in obdelovalne površine.

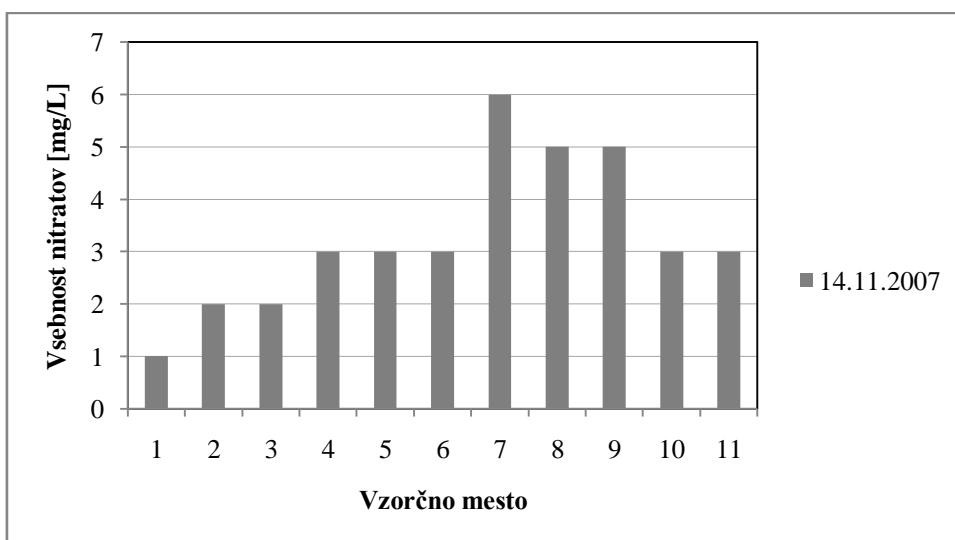
### 6.1.4 pH



Slika 10: pH preučevanih vodotokov 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica)

Izmerjene vrednosti pH so bile od 7 do 8, kar je običajno za večino naravnih voda in je odraz karbonatne podlage.

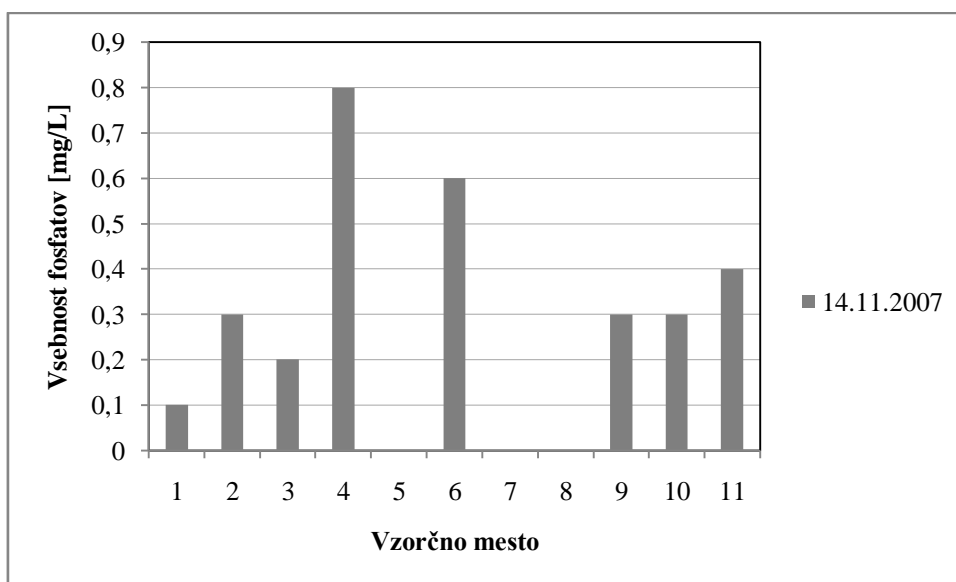
### 6.1.5 Vsebnost nitratnih ionov



Slika 11: Vsebnost nitratnih ionov v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica)

Izmerjene vsebnosti nitratov so bile nizke in sicer od 1 mg/L do 6 mg/L. Najnižja vsebnost nitratov je bila izmerjena na prvi referenčni točki, najvišja pa na vzorčnem mestu 7 na potoku Bičje. V Grosupeljščici je bila izmerjena vsebnost 3 mg/L na kar treh vzorčnih mestih (vzorčna mesta 4, 5, in 6), le na mestu 3 je bila vsebnost nitratov nekoliko manjša, to je pred Grosupljem. Na mestih 8 in 9 smo izmerili vsebnost nitratov 5 mg/L, to je pred vtokom in na iztoku komunalne čistilne naprave. Dolvodno od komunalne čistilne naprave pa vrednost zopet pade.

### 6.1.6 Vsebnost fosfatnih ionov



Slika 12: Vsebnost fosfatnih ionov v preučevanih vodotokih 14.11.2007 (vzorčno mesto: 1-2: referenčno mesto, 3-6: Grosupeljščica, 7-9: Bičje, 10-11: Podlomščica; meja detekcije: 0,1 mg/L)

Izmerjene vrednosti fosfatnih ionov so bile od pod mejo detekcije do 0,8 mg/L. Najnižjo vrednost smo izmerili na treh vzorčnih mestih: 5, 7 in 8. Prvo vzorčno mesto je Grosupeljščica za Adamičevim mostom v Grosuplju, mesti 7 in 8 pa sta na Bičju pred iztokom komunalne čistilne naprave. Vidna je razlika pred in po iztoku komunalne čistilne naprave, saj so izmerjene vrednosti na mestih 7 in 8, ki sta pred iztokom, pod mejo detekcije, od iztoka naprej pa je vsebnost fosfatov povečana. Najvišjo vrednost smo izmerili na mestu 4, to je Grosupeljščica v Jerovi vasi.

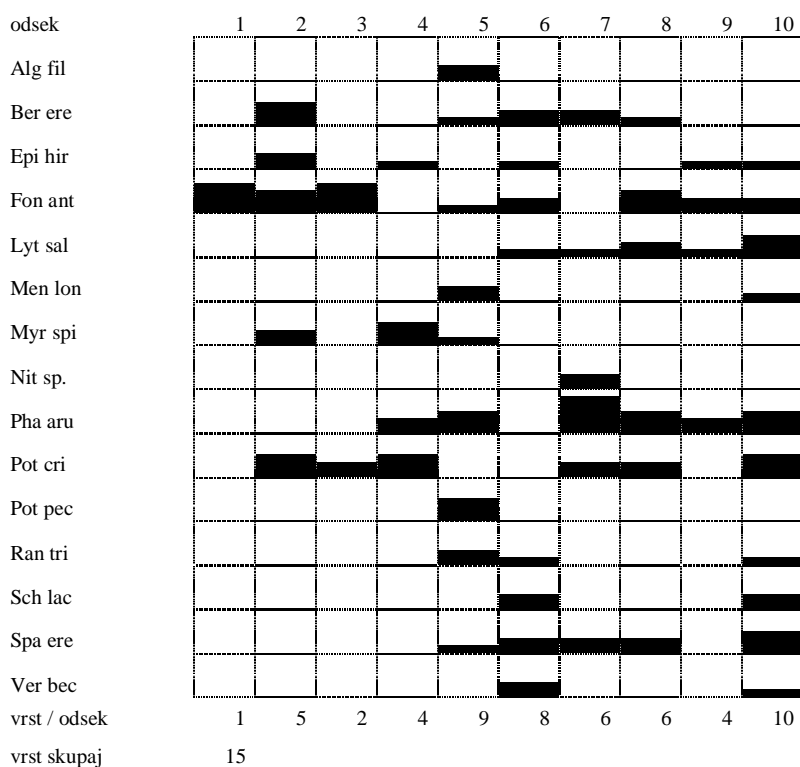
## 6.2 MAKROFITI

### 6.2.1 Pojavljanje in pogostost makrofitov

Preglednica 3: Seznam rastlinskih vrst popisanih v izbranih vodotokih (G-Grosupeljščica, P-Podlomščica)

Latinsko ime	Okrajšava	Slovensko ime	Oblika	Vodotok
<i>Alisma plantago-aquatica</i> L.	Ali pla	trpotčasti porečnik	he	P
<i>Algae filamentose</i>	Alg fil	nitaste alge	sp	P, G
<i>Berula erecta</i> (Huds) Coville	Ber ere	ozkolistni košček	sa	G
<i>Brachythecium rivulare</i> Schimp.	Bra riv		sa	P
<i>Callitriche</i> sp.	Cal sp.	žabji las	sa	P
<i>Caltha palustris</i> L.	Cal pal	navadna kalužnica	he	P
<i>Nitella</i> sp.	Nit sp.	nitela	sa	P, G
<i>Conocephalum conicum</i> (L.) Corda.	Con con		he	P
<i>Elodea canadensis</i> L. C. Rich	Elo can	navadna račja zel	sa	P
<i>Epilobium parviflorum</i> Schreber	Epi par	drobnocvetni vrbovec	he	P
<i>Epilobium hrsutum</i> L.	Epi hir	dlakavi vrbovec	he	G
<i>Equisetum arvense</i> L.	Equ arv	njivska preslica	he	P
<i>Fontinalis antipyretica</i> Hedw.	Fon ant		sa	P, G
<i>Lythrum salicaria</i> L.	Lyt sal	navadna krvenka	he	G
<i>Lysimachia nummularia</i> L.	Lys num	okroglostna pijavčnica	he	P
<i>Mentha aquatica</i> L.	Men aqu	vodna meta	am	P
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Hudson	Men lon	dolgolistna meta	he	P, G
<i>Myriophyllum spicatum</i> L.	Myr spi	klasasti rmanec	sa	P, G
<i>Myosotis scorpioides</i> L.	Myo sco	močvirska spominčica	am	P
<i>Nasturtium officinale</i> R. Br. in Aiton	Nas off	navadna vodna kreša	sa	P
<i>Nuphar luteum</i> (L.) Sibith & Sm.	Nup lut	rumeni blatnik	fl	P
<i>Phalaris arundinacea</i> L.	Pha aru	pisana čužka	he	P, G
<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin ex Streud.	Phr aus	navadni trst	he	P
<i>Potamogeton crispus</i> L.	Pot cri	kodravi dristavec	sa	P, G
<i>Potamogeton nodosus</i> Poir	Pot nod	kolenčasti dristavec	fl	P
<i>Potamogeton pectinatus</i> L.	Pot pec	češljasti dristavec	sa	P, G
<i>Ranunculus trichophyllus</i> Chaix	Ran tri	lasastolistna vodna zlatica	sa	P, G
<i>Schoenoplectus lacustris</i> (L.) Palla	Sch lac	jezerski biček	he	P, G
<i>Sparganium erectum</i> agg.	Spa agg	pokončni ježek	he	P, G
<i>Typha latifolia</i> L.	Typ lat	širokolistni rogoz	he	P
<i>Veronica beccabunga</i> L.	Ver bec	studenčni jetičnik	he	P, G

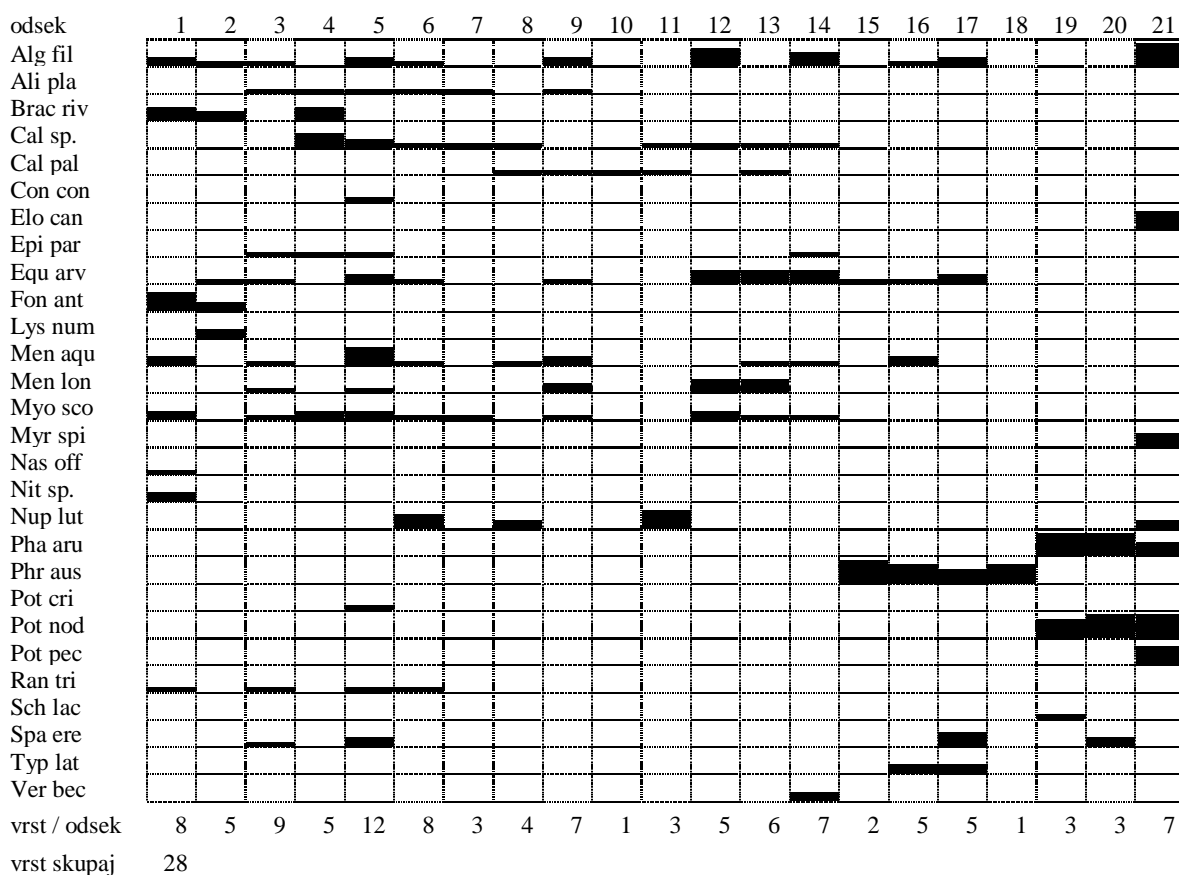
V izbranih vodotokih smo popisali 31 rastlinskih taksonov, ki so navedeni v zgornji preglednici. V Grosupeljščici smo na odsekih v skupni dolžini 1000 m popisali 15 taksonov, v Podlomščici pa 28 taksonov na dolžini 2100 m. Od tega je bilo 12 taksonov prisotnih v obeh vodotokih. Med popisanimi taksoni je bila najpogostejša rastna oblika helofiti (15 taksonov), 11 taksonov spada med potopljene ukoreninjene rastline (sa), 2 taksona med rastline z amfibijskim značajem (am), 2 taksona med plavajoče ukoreninjene rastline (fl) in 1 takson med potopljene neukoreninjene rastline (sp).



Slika 13: Razporeditev in pogostost makrofitov vodotoka Grosupeljščica

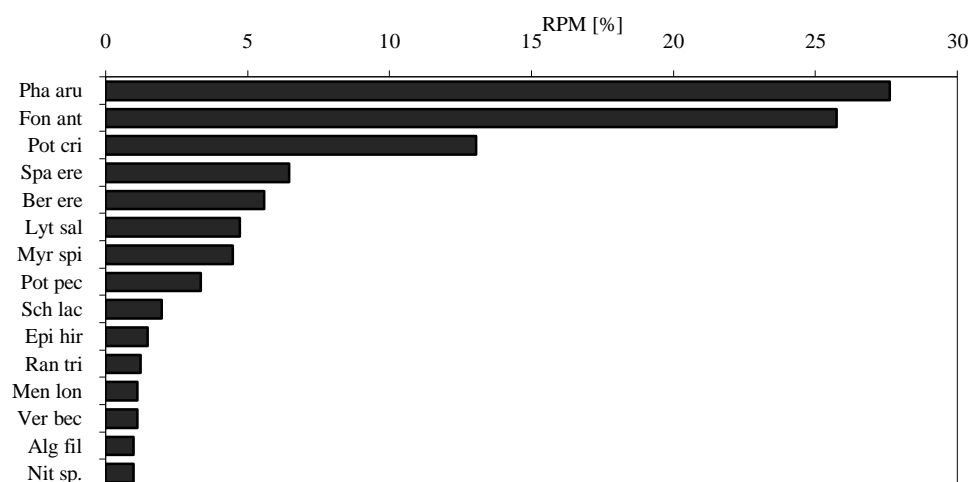
V Grosupeljščici je bilo največ vrst prisotnih v odsekih 5, 6 in 10 (Slika 13). V petem odseku je bilo popisanih 9 vrst, v šestem 8, v desetem, zadnjem odseku Grosupeljščice pa 10 vrst. Odseka 5 in 6 sta v predelu, kjer potok priteče iz mesta in je v vodi prisotnih več hranil. Poleg tega je senčenje struge tu manjše kot v prejšnjih odsekih, kjer potok teče skozi mesto. Kljub manjšemu senčenju je v zadnjem delu struge (odseki od 7 do 10) z izjemo zadnjega odseka zopet prisotnih manj vrst. Tu potok teče prek kmetijskih površin. Najmanj vrst (1 vrsta) je bilo prisotnih v prvem odseku, pred Jerovo vasjo, kjer je potok močno zasenčen in še neobremenjen s hranili.





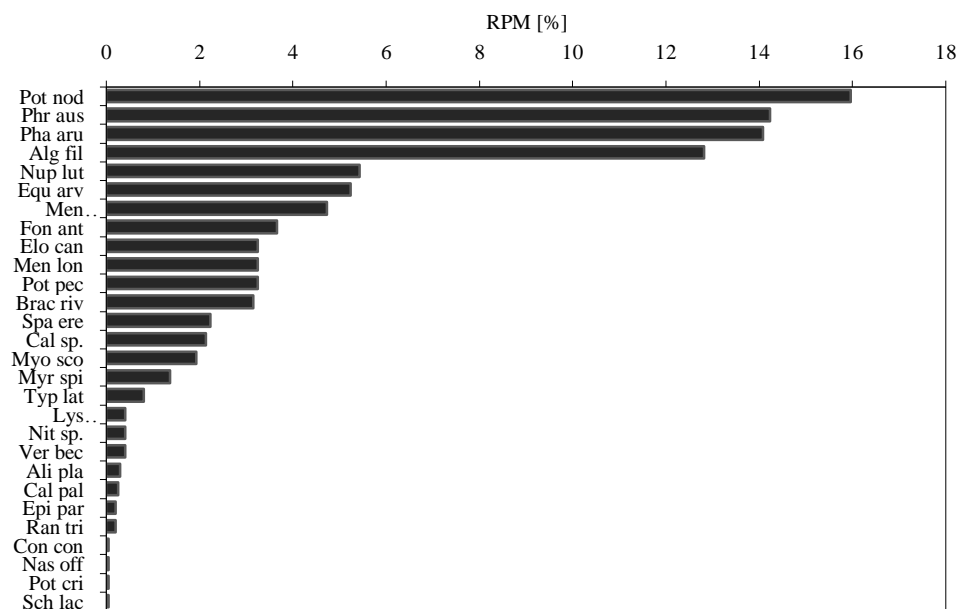
Slika 14: Razporeditev in pogostost makrofitov vodotoka Podlomščica

V Podlomščici (Slika 14) je bilo največ taksonov in sicer 12 prisotnih v petem odseku, kjer potok teče ob robu gozda. Najmanj taksonov je bilo prisotnih v odsekih 10 in 18. Odsek 10 je močno osenčen, odsek 18 pa se nahaja takoj za komunalno čistilno napravo. V zgornjem delu vodotok vijuga skozi gozd in travnike ( od odseka 1 do odseka 12), zato je manjše število taksonov na nekaterih odsekih posledica senčenja struge. Na odsekih 13 do 19 je struga regulirana in tu je prisotnih nekaj manj taksonov, kljub manjšemu senčenju struge. Viden je tudi vpliv komunalne čistilne naprave na vodno vegetacijo, saj je v prvih treh odsekih od čistilne naprave dolvodno, prisotnih zelo malo taksonov.



Slika 15: Relativna rastlinska masa (RPM) makrofitov vodotoka Grosupeljščica

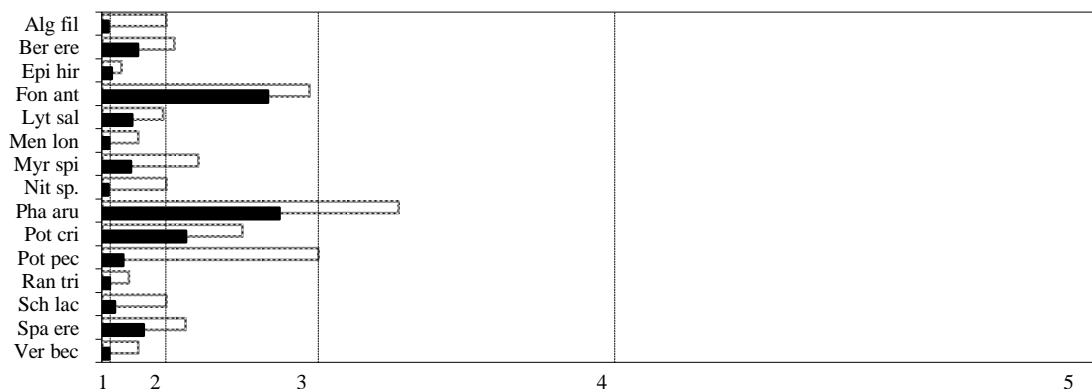
V Grosupeljščici ima v pregledanih odsekih najvišjo relativno rastlinsko maso (RPM) vrsta *Phalaris arundinacea* (27,6%) (Slika 15). Sledita ji vrsti *Fontinalis antipyretica* (25,7%) in *Potamogeton crispus* (13,0%). Najnižjo relativno rastlinsko maso imajo nitaste zelene alge in *Nitella* sp. in sicer 0,9%.



Slika 16: Relativna rastlinska masa (RPM) makrofitov vodotoka Podlomščica

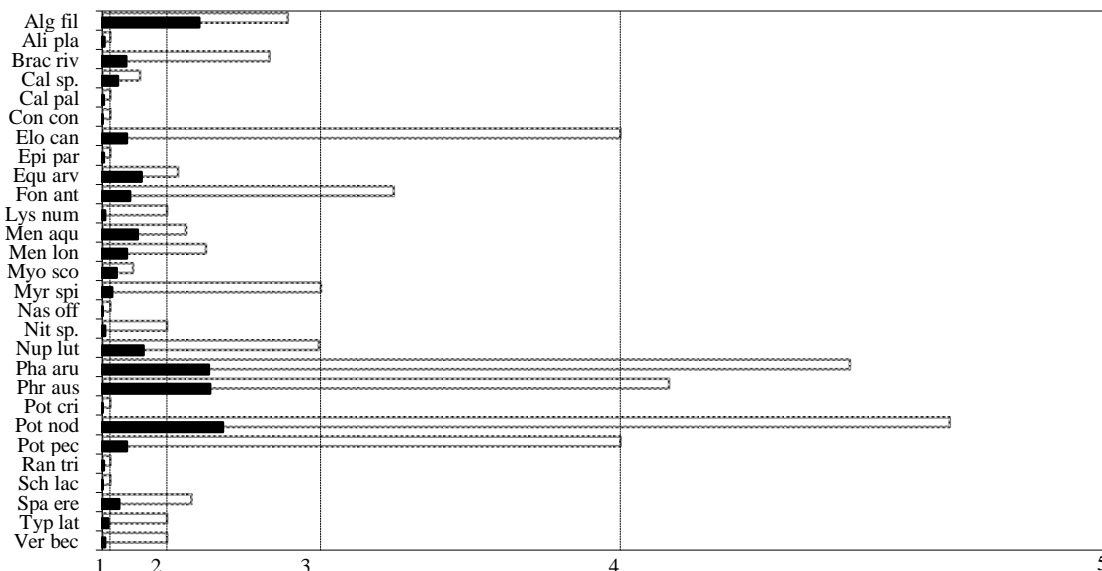
V Podlomščici ima v pregledanih odsekih najvišjo relativno rastlinsko maso (RPM) vrsta *Potamogeton nodosus* (15,9%) (Slika 16). Sledijo ji vrste *Phragmites australis* (14,2%),

*Phalaris arundinacea* (14,0%) in nitaste zelene alge (12,8%). Najnižjo relativno rastlinsko maso (0,05%) pa imajo vrste: *Conocephalum conicum*, *Nasturtium officinale*, *Potamogeton crispus* in *Schoenoplectus lacustris*.



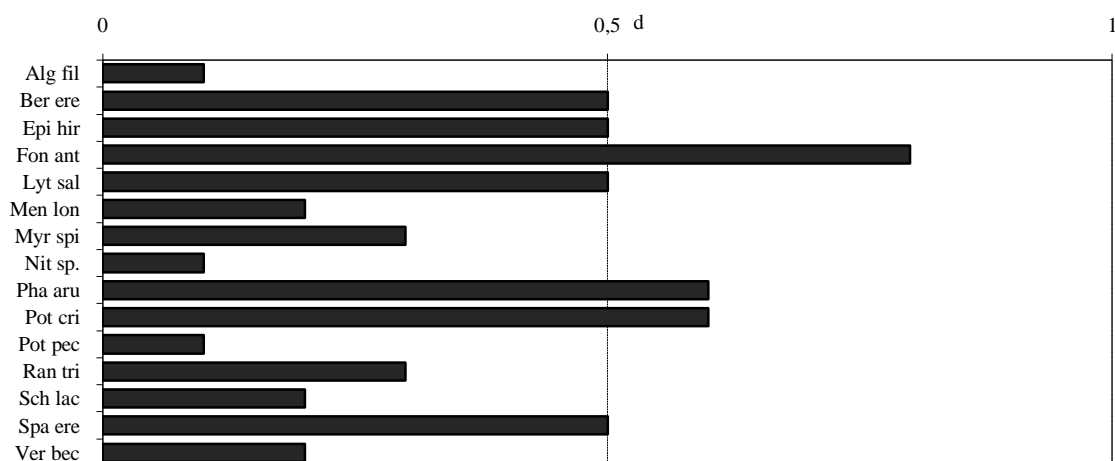
Slika 17: Povprečni masni indeks posameznih taksonov vodotoka Grosupeljščica (črne oznake-MMT, bele oznake-MMO)

Najvišji povprečni masni indeks vrste v odsekih Grosupeljščice, kjer se vrsta pojavlja (MMO, Slika 17), doseže vrsta *Phalaris arundinacea*. Sledita ji vrsti *Fontinalis antipyretica* in *Potamogeton pectinatus*.



Slika 18: Povprečni masni indeks posameznih taksonov vodotoka Podlomščica (črne oznake-MMT, bele oznake-MMO)

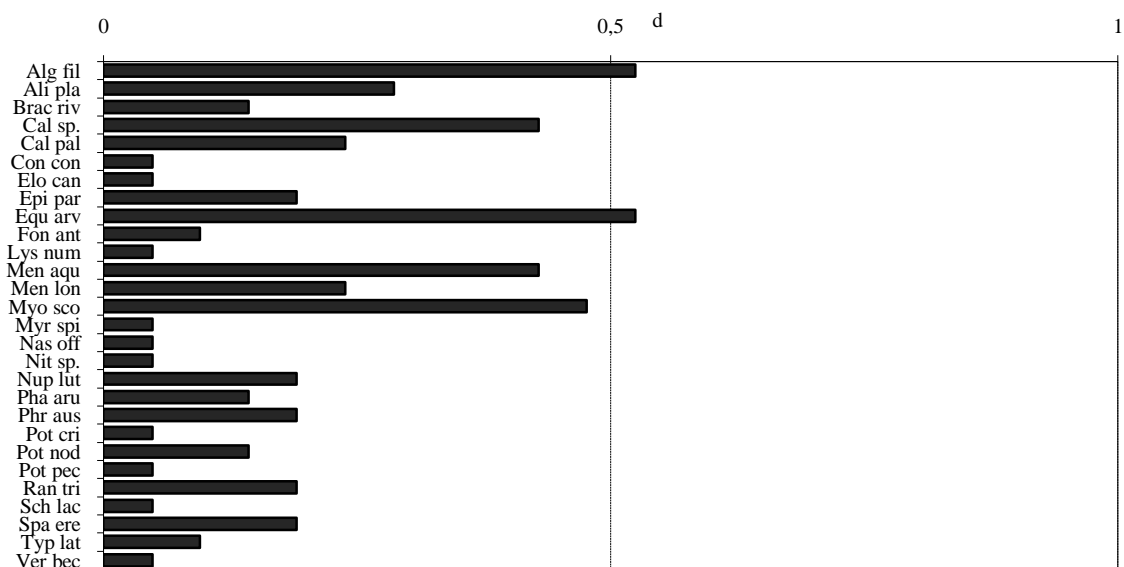
Najvišji povprečni masni indeks vrste v odsekih Podlomščice, kjer se vrsta pojavlja (MMO, Slika 18), doseže vrsta *Potamogeton nodosus*. Sledijo ji vrste *Phalaris arundinacea*, *Phragmites australis*, *Elodea canadensis* in *Potamogeton pectinatus*.



Slika 19: Razmerje povprečnih masnih indeksov MMT in MMO v vodotoku Grosupeljščica; d = 0,5 pomeni, da je bil takson prisoten v polovici pregledanih odsekov, d = 1 pomeni, da je bil takson prisoten v vseh pregledanih odsekih

V največ pregledanih odsekih Grosupeljščice je prisotna vrsta *Fontinalis antipyretica* z vrednostjo d = 0,8 (Slika 19). Z vrednostjo d = 0,6 ji sledita vrsti *Phalaris arundinacea* in *Potamogeton crispus*. V polovici pregledanih odsekov se pojavljajo vrste: *Berula erecta*, *Epilobium hirsutum*, *Lythrum salicaria* in *Sparganium erectum* agg.. Ostale vrste so prisotne v manj kot polovici pregledanih odsekov. V samo enem od pregledanih odsekov se pojavljajo *Potamogeton pectinatus*, *Nitella* sp. in nitaste zelene alge.

V največ pregledanih odsekih Podlomščice sta z vrednostjo d = 0,524 prisotni vrsti *Aquisetum arvense* in nitaste zelene alge (Slika 20). Sledijo jima vrste *Myosotis scorpioides*, *Callitriche* sp. in *Mentha aquatica*. Vse vrste razen prvih dveh so prisotne v manj kot polovici pregledanih odsekov. S slike je razvidno, da kar deset vrst dosega najmanjšo vrednost, to je d = 0,048.



Slika 20: Razmerje povprečnih masnih indeksov MMT in MMO v vodotoku Podlomščica;  $d = 0,5$  pomeni, da je bil takson prisoten v polovici pregledanih odsekov,  $d = 1$  pomeni, da je bil takson prisoten v vseh pregledanih odsekih

Glede na pojavljanje makrofitov lahko Grosupeljščico razdelimo na tri dele (Slika 13). Prvi del predstavlja prvi odsek pred Jerovo vasjo, kjer uspeva samo mah *Fontinalis antipyretica*. Tudi od prvega odseka gorvodno ima struga zelo podobne značilnosti. Drugi del predstavljajo odseki od 2 do 4, kjer sta značilni vrsti *Myriophyllum spicatum* in *Potamogeton crispus*. Za zadnji del (odseki 5 do 10) so značilne vrste *Phalaris arundinacea*, *Sparganium erectum* agg., *Lythrum salicaria* in *Berula erecta*. Podobno kot v drugem delu je tudi tu zastopana vrsta *Potamogeton crispus*. Mah *Fontinalis antipyretica* se pojavlja v vseh treh delih vodotoka. Vidna je tudi razlika v številu vrst med posameznimi deli vodotoka.

Podlomščico lahko glede na pojavljanje makrofitov razdelimo na tri dele (Slika 14). Prvi, povirni del predstavljata odseka 1 in 2. Med značilne vrste spadata mahova *Fontinalis antipyretica* in *Brachythecium rivulare* ter nitaste zelene alge. Tu uspeva tudi za izvire značilna vrsta *Nasturtium officinale*. Drugi del predstavljajo odseki od 3 do 14, kjer potok teče skozi gozd in prek travnikov. Tu so značilne vrste *Alisma-plantago aquatica*, *Callitriche* sp., *Equisetum arvense*, *Mentha aquatica*, *Mentha longifolia*, *Myosotis scorpioides* in *Nuphar luteum*. Tretji del predstavljajo odseki od 15 naprej, kjer je vodotok

z izjemo zadnjih dveh odsekov reguliran. Značilne vrste zadnjega odseka so *Phragmites australis*, *Potamogeton nodosus* in *Phalaris arundinacea*. V vseh treh delih vodotoka se pojavljajo nitaste zelene alge, *Mentha aquatica* in *Equisetum arvense*. Število vrst po odsekih niha v vseh treh delih vodotoka. Vidna je sprememba v strukturi združbe, predvsem od odseka 18 dolvodno, ki se nahaja za komunalno čistilno napravo.

### 6.2.2 Kanonična korenspodenčna analiza (CCA)

Za CCA analizo smo združili oba potoka, ker je pogoj, da je število vzorčnih mest večje od števila spremenljivk, kar pa pri Grosupeljščici ni. Od dvanajstih dejavnikov okolja le šest dejavnikov statistično značilno pojasnjuje pojavljanje in razporeditev makrofitov; pojavljanje brzic, tolmunov in meandrov (s\_btm), spodjedanje brega (b\_spodj), vegetacija obrežnega pasu (op\_veg), oblika struge (s\_oblik), dno vodotoka (s\_dno), detrit (s\_detr). Šest dejavnikov okolja je bilo statistično neznačilnih; izraba tal za obrežnim pasom (zaledje), širina obrežnega pasu (op\_šir), sklenjenost obrežne vegetacije (op\_skl), zadrževalne strukture v strugi (s\_zadr), struktura sedimenta (s\_sedim), struktura brega (b\_struk).

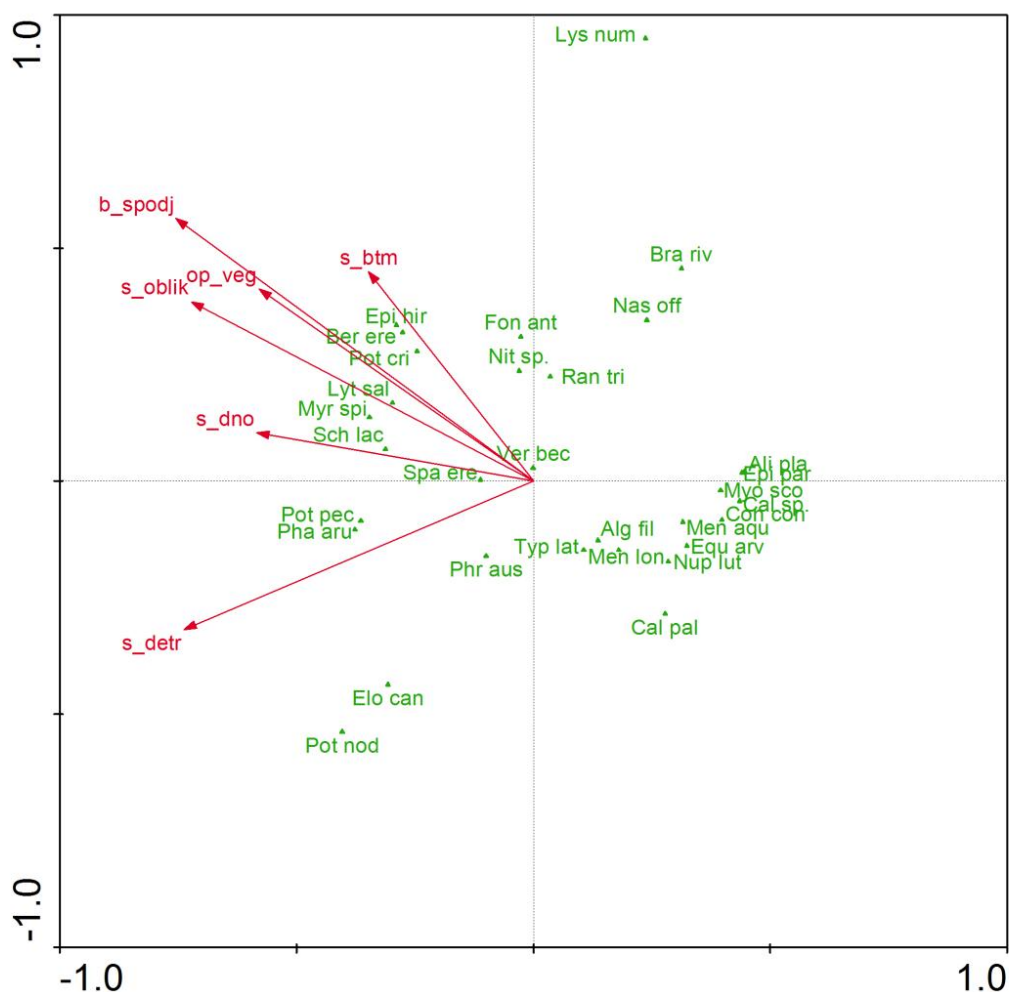
Preglednica 4: Lastne vrednosti, kumulativni pojasnjeni odstotki varianc in korelacijski koeficienti obdelanih podatkov

KANONIČNA OS	1	2	3	4	Skupna variabilnost
Lastne vrednosti	0,628	0,427	0,336	0,252	5,237
Korelacijski koeficient taksoni-okoljske spremenljivke	0,936	0,886	0,764	0,827	
Kumulativni pojasnjeni odstotek variance taksonov	12,0	20,1	26,6	31,4	
Kumulativni pojasnjeni odstotek variance relacije takson-okolje	35,5	56,2	74,1	87,6	

V zgornji preglednici so prikazane lastne vrednosti ordinacijske osi, ki predstavljajo maksimalne ločenosti ekoloških niš taksonov. Najvišjo lastno vrednost in posledično najmočnejšo smer gradienta ima prva kanonična os (0,628). S prvo osjo smo statistično

pojasnili 12,0% variance taksonov, z drugo osjo 7,1% (skupaj 20,1%) in z vsemi osmi skupaj 31,4% variance taksonov. S prvo osjo smo statistično pojasnili 35,5% variance relacije takson-okolje, s prvima dvema osema skupaj pa 56,2%. Z vsemi osmi smo skupno pojasnili 87,6% variance relacije takson-okolje.

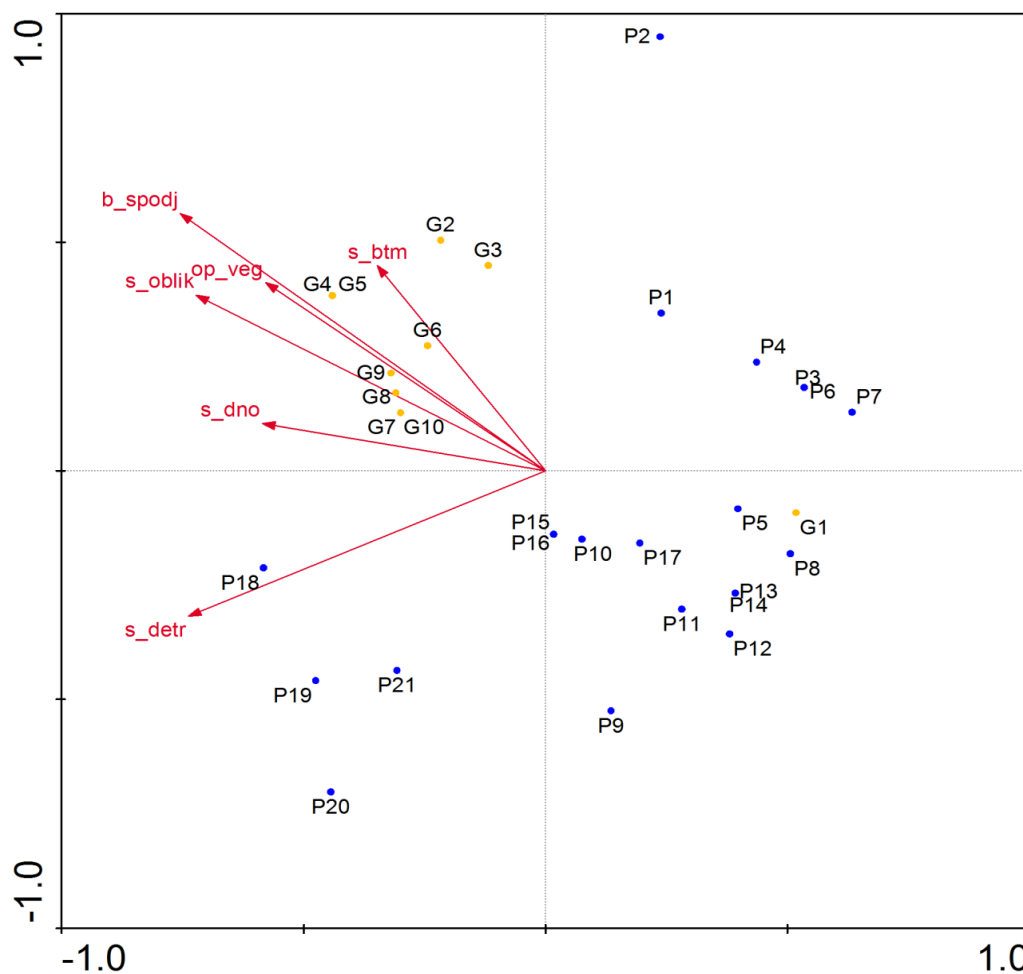
Dejavniki okolja so ponazorjeni z vektorji. Dolžina vektorja ponazarja vpliv določene spremenljivke na pojavljanje taksonov, torej večja puščica pomeni večji vpliv. Na taksone, ki so razporejeni vzdolž vektorja, ima dejavnik, ki ga ta vektor ponazarja, največji vpliv. Sredina diagrama pomeni srednjo vrednost izbranega okoljskega dejavnika, vrhovi vektorjev pa ponazarjajo zadnjo stopnjo kakovostnega gradienta dejavnika, ki ga vektor ponazarja. Točke vrst na ordinacijskem diagramu ponazarjajo optimume vrst glede na okoljske dejavnike. Iz tega sledi, da se na sredini diagrama nahajajo vrste, ki se v okolju pojavljajo pri srednjih vrednostih izbranih spremenljivk. Ostri kot med vektorji pomeni pozitivno korelacijo med okoljskimi dejavniki, ki jih vektorji ponazarjajo.



Slika 21: Ordinacijski diagram z izbranimi dejavniki okolja in makrofitskimi taksoni

Iz zgornjega ordinacijskega diagrama so razvidne velikosti vplivov izbranih dejavnikov okolja in njihov vpliv na pojavljanje taksonov. Največji vpliv na pojavljanje makrofitov imajo spodjedanje brega, detrit, oblika struge in vegetacija obrežnega pasu. *Veronica beccabunga* se pojavlja pri srednjih vrednostih izbranih okoljskih dejavnikov. Taksoni, ki so si na diagramu blizu, se v naravi pojavljajo v zelo podobnih ali enakih okoljskih razmerah. Vrste, ki so na diagramu locirane stran od vektorjev okoljskih dejavnikov, so z le-timi negativno korelirane. To so na primer *Caltha palustris*, *Alisma plantago-aquatica* in *Epilobium parviflorum*.





Slika 22: Ordinacijski diagram z izbranimi dejavniki okolja in odseki izbranih vodotokov (G-Grosupeljščica, P-Podlomščica)

Iz zgornjega diagrama so razvidne velikosti vplivov izbranih dejavnikov okolja in povezava s posameznimi odseki vodotokov. Na odsekih vodotokov, ki so na diagramu skupaj, so podobni okoljski dejavniki in podobna vrstna sestava. Z diagrama je razvidno, da se izbrani okoljski dejavniki in vrstna sestava v Grosupeljščici in Podlomščici razlikujejo, na odsekih posameznega vodotoka pa so si bolj podobni. Večinoma so odseki Podlomščice glede na izbrane dejavnike v boljšem stanju kot odseki Grosupeljščice z izjemo prvega odseka (G1). Razvidno je tudi, da so si glede na vrstno sestavo in okoljske dejavnike, odseki Podlomščice v zgornjem, srednjem oziroma nižinskem delu med seboj zelo podobni. Kvaliteta okoljskih dejavnikov se od izvira dolvodno slabša.

### 6.3 ŠIRŠA OKOLJSKA OCENA VODOTOKOV

Rezultati širše okoljske ocene po RCE metodi za Grosupeljščico uvrščajo potok v nižje kakovostne razrede (Slika 25). Prvi odsek pred Jerovo vasjo spada v tretji kakovostni razred, naslednjih 6 odsekov v peti kakovostni razred in zadnji trije odseki v četrti kakovostni razred. Ključni parametri za nizko število točk so zaledje, obrežna vegetacija in dejstvo, da je vodotok skozi mesto Grosuplje kanaliziran, od Grosuplja dolvodno pa reguliran (Slika 23).

Podlomščica na izviru spada v prvi kakovostni razred in predstavlja referenčno mesto (Slika 26). Odseki v zgornjem del vodotoka večinoma spadajo v drugi kakovostni razred. V tem delu je dokaj ohranjena naravna struga. Ključni parametri za visoko število točk so obrežna vegetacija, oblika in usedline v strugi ter detrit (Slika 24). Od odseka 12 do 14, ko pride potok v nižino, spada Podlomščica v tretji kakovostni razred. Na odsekih 15 do 19 pa v četrti in peti kakovostni razred. Vodotok je na teh mestih reguliran, obrežna vegetacija je večinoma odsotna in spremeni se zaledje, kar pomembno prispeva k nizkemu številu točk na teh odsekih. Najmanjše število točk je na odseku 18, ki je takoj za komunalno čistilno napravo. Zadnja dva odseka spadata v tretji kakovostni razred. Tu struga zopet meandrira in pojavi se sklenjena obrežna vegetacija.

Št. odseka \ Parameter	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Izraba tal za obrežnim pasom	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Širina obrežnega pasu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Sklenjenost vegetacije	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Vegetacija obrežnega pasu	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Zadrževalne strukture	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Oblika struge	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Usedline v strugi	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Struktura brega	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Spodjedanje brega	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Dno vodotoka	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Brzice, tolmuni, meandri	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Detrit	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Slika 23: Širša okoljska ocena vodotoka Grosupeljščica

Parameter	Št. odseka										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Izraba tal za obrežnim pasom											
Širina obrežnega pasu											
Sklenjenost vegetacije											
Vegetacija obrežnega pasu											
Zadrževalne strukture											
Oblika struge											
Usedline v strugi											
Struktura brega											
Spodjedanje brega											
Dno vodotoka											
Brzice, tolmuni, meandri											
Detrit											

Parameter	Št. odseka										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Izraba tal za obrežnim pasom											
Širina obrežnega pasu											
Sklenjenost vegetacije											
Vegetacija obrežnega pasu											
Zadrževalne strukture											
Oblika struge											
Usedline v strugi											
Struktura brega											
Spodjedanje brega											
Dno vodotoka											
Brzice, tolmuni, meandri											
Detrit											

Legenda:

Neokrnjeno stanje (največ točk za parameter)

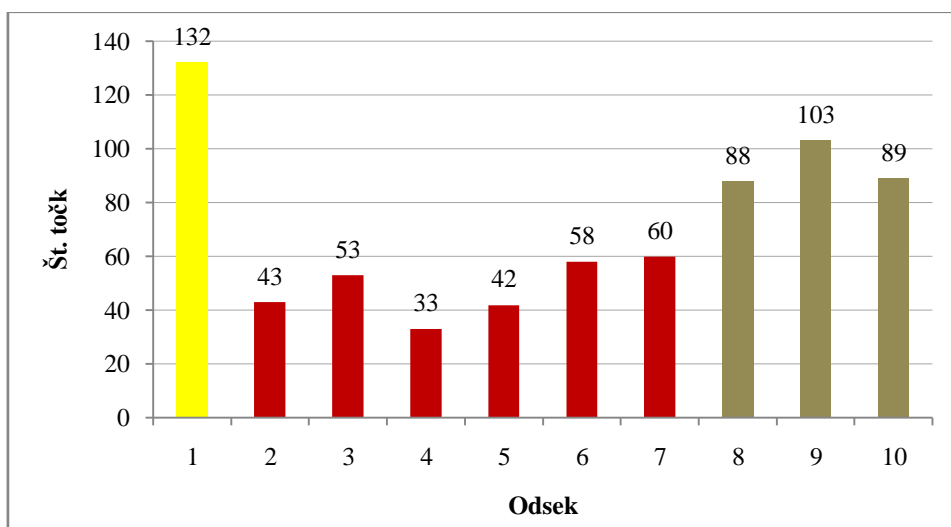
Dobro stanje

Slabše stanje

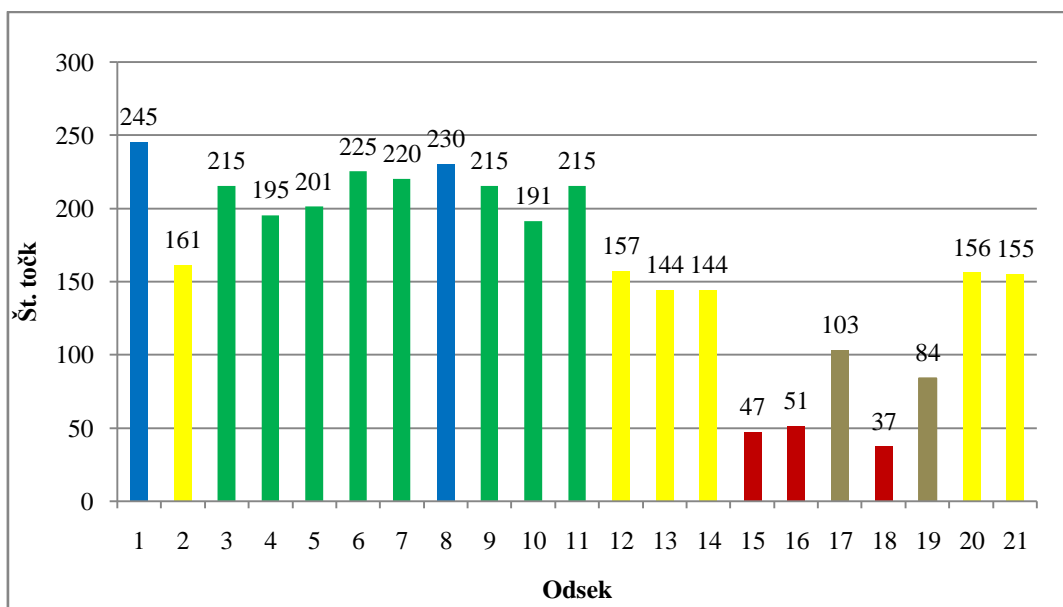
Najslabše stanje (najmanj točk za parameter)



Slika 24: Širša okoljska ocena vodotoka Podlomščica



Slika 25: Število točk in kakovostni razredi odsekov vodotoka Grosupeljščica



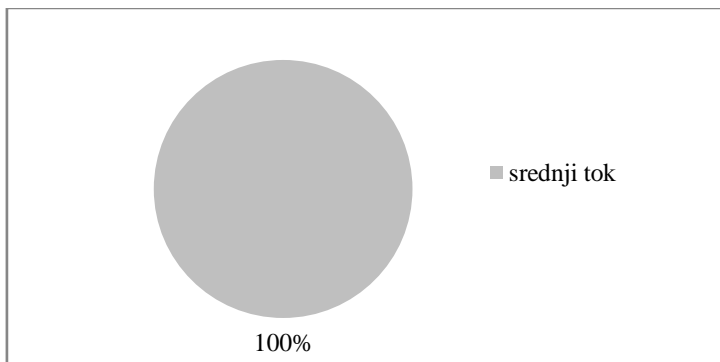
Legenda:

Kakovostni razred	Št. točk	Ocena	
I	227-280	odlično	<span style="color: blue;">■</span>
II	173-226	zelo dobro	<span style="color: green;">■</span>
III	119-172	dobro	<span style="color: yellow;">■</span>
IV	65-118	slabo	<span style="color: brown;">■</span>
V	12-64	zelo slabo	<span style="color: red;">■</span>

Slika 26: Število točk in kakovostni razredi odsekov vodotoka Podlomščica

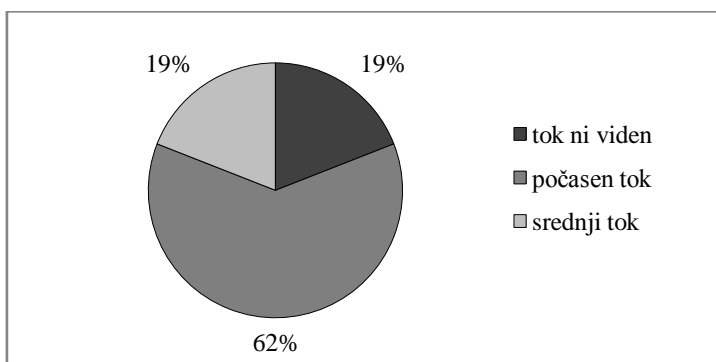
## 6.4 OCENA HABITATNIH PARAMETROV

### 6.4.1 Hitrost vodnega toka



Slika 27: Ocena hitrosti vodnega toka vodotoka Grosupeljščica

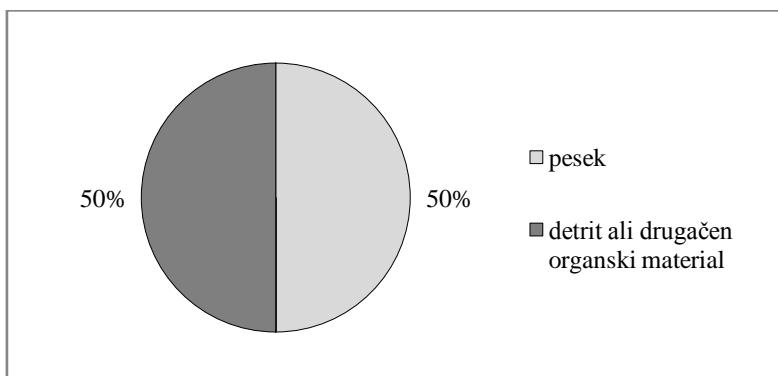
V Grosupeljščici je na vseh pregledanih odsekih srednje hiter vodni tok (Slika 27). To je hitrost toka od 35 do 65 cm/s. Za natančno klasifikacijo hitrosti vodnega toka glej: Priloga B: Metoda popisovanja makrofitov in ocene habitata (Janauer, 2002).



Slika 28: Ocena hitrosti vodnega toka vodotoka Podlomščica

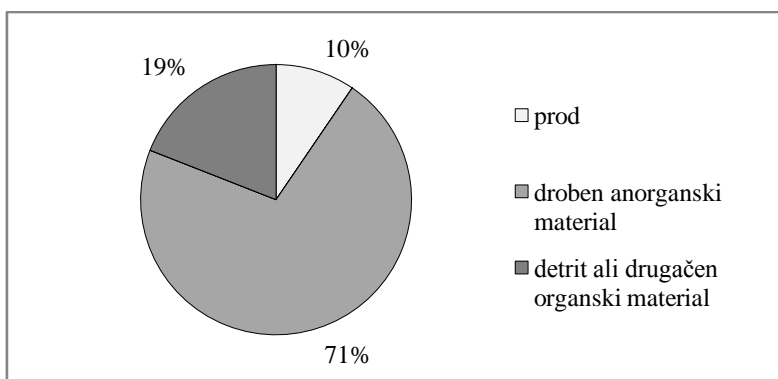
Podlomščica je značilni kraški potok z majhnim strmecem in posledično je vodni tok na večini odsekov počasen (62%) (Slika 28). Na 19% odsekov tok ni bil viden, na 19% odsekov pa je bil srednje hiter. Tok postane močnejši po pritoku Bičja tik pred komunalno čistilno napravo.

#### 6.4.2 Tip sedimenta



Slika 29: Ocena tipa sedimenta v vodotoku Grosupeljščica

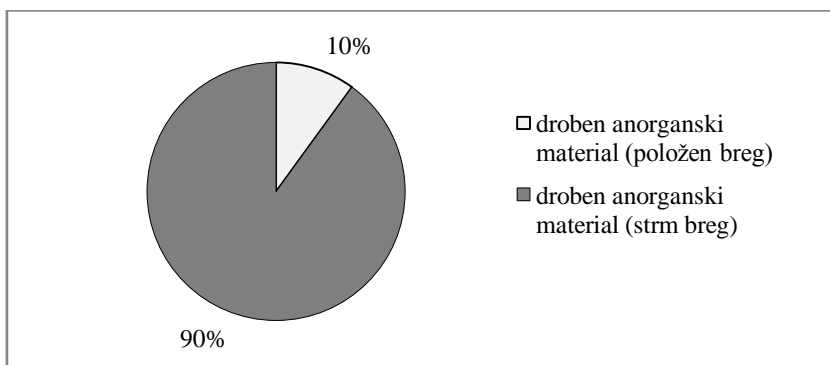
V Grosupeljščici je v prvi polovici odsekov peščen sediment (Slika 29). V drugi polovici odsekov, ko potok teče prek kmetijskih površin, prevladuje detrit ali drugačen organski material. Za natančno klasifikacijo tipa sedimenta glej: Priloga B: Metoda popisovanja makrofitov in ocene habitata (Janauer, 2002).



Slika 30: Ocena tipa sedimenta v vodotoku Podlomščica

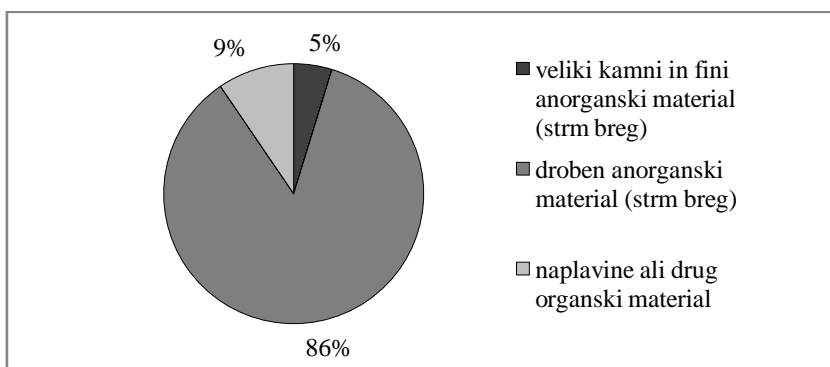
V Podlomščici v sedimentih prevladuje droben anorganski material (71%) (Slika 30). V 19% pregledanih odsekov smo določili detrit ali drugačen organski material, ki se pojavlja v nižinskem delu vodotoka. Na povirnem delu vodotoka so sedimenti prodnati (10% pregledanih odsekov).

### 6.4.3 Struktura brega



Slika 31: Ocena strukture brega vodotoka Grosupeljščica

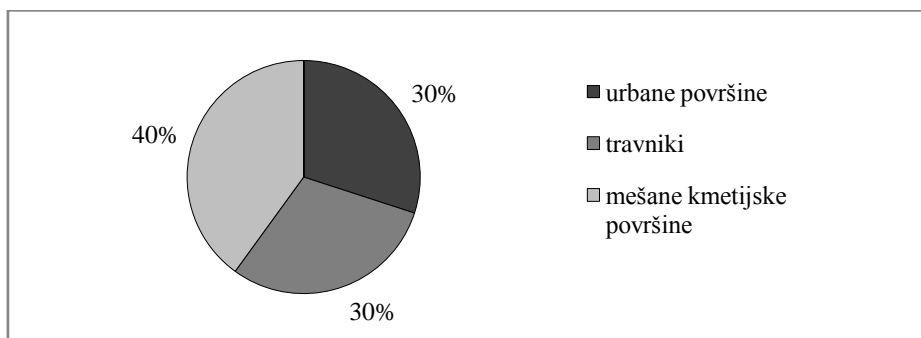
Breg Grosupeljščice je v celoti iz drobnega anorganskega materiala (Slika 31). Na 90% pregledanih odsekov je breg strm, na 10% pa položen. Za natančno klasifikacijo strukture brega glej: Priloga B: Metoda popisovanja makrofitov in ocene habitata (Janauer 2002).



Slika 32: Ocena strukture brega vodotoka Podlomščica

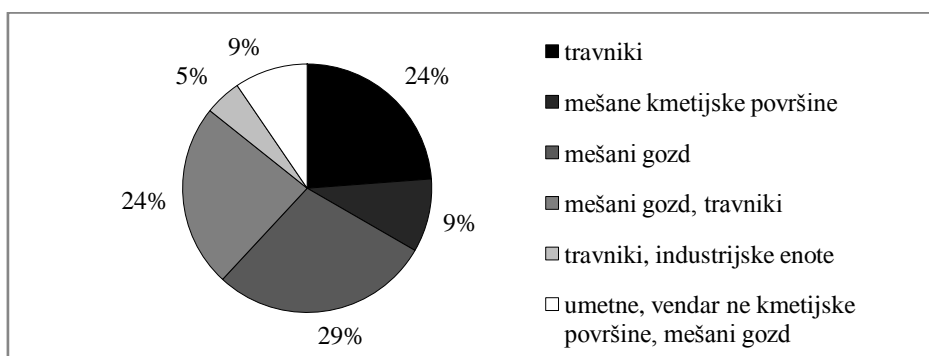
Na 86% pregledanih odsekov je breg Podlomščice strm, iz drobnega anorganskega materiala (Slika 32). Na 9% pregledanih odsekov (zadnja dva odseka) breg gradijo naplavine ali drug organski material. Na izviru je breg strm, iz velikih kamnov in finega anorganskega materiala (5%).

#### 6.4.4 Tip zaledja



Slika 33: Ocena tipa zaledja vodotoka Grosupeljščica

V zaledju Grosupeljščice prevladujejo mešane kmetijske površine (40%), predvsem v zadnjem delu struge (Slika 33). Na 30% pregledanih odsekov potok teče preko urbanih površin in sicer skozi mesto Grosuplje. Na 30% pa potok teče preko mešanih kmetijskih površin. Za natančno klasifikacijo tipa zaledja glej: Priloga B: Metoda popisovanja makrofitov in ocene habitata (Janauer 2002).

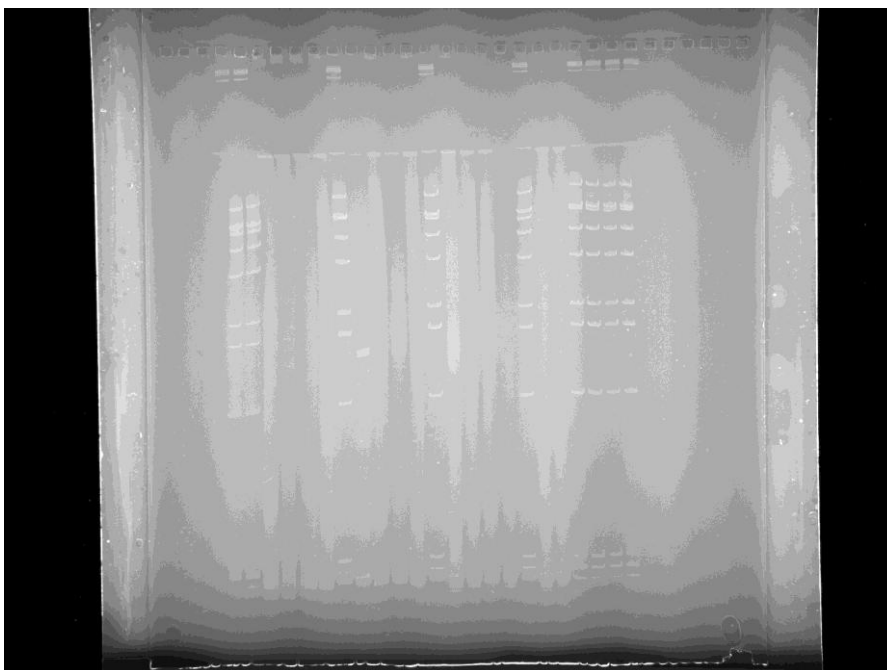


Slika 34: Ocena tipa zaledja vodotoka Podlomščica

V zaledju Podlomščice je predvsem mešani gozd (29% pregledanih odsekov) in mešani gozd skupaj s travniki (24%) (Slika 34). To zaledje je značilno za zgornji del potoka. Ko potok doseže ravninski del in pride iz gozda, so v zaledju travniki (24%) in mešane kmetijske površine (9%), na zadnjih dveh odsekih pa zopet mešani gozd. Umetne, vendar ne kmetijske površine skupaj z mešanim gozdom so na dveh odsekih (9%) in sicer takoj za izviro in na začetku nižinskega dela vodotoka. Odsek pri komunalni čistilni napravi ima v zaledju travnike in industrijske enote (5%).



## 6.5 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE SEDIMENTOV



Slika 35: TGGE 26.2.2009 (220 V, 16h, 40-46°C)

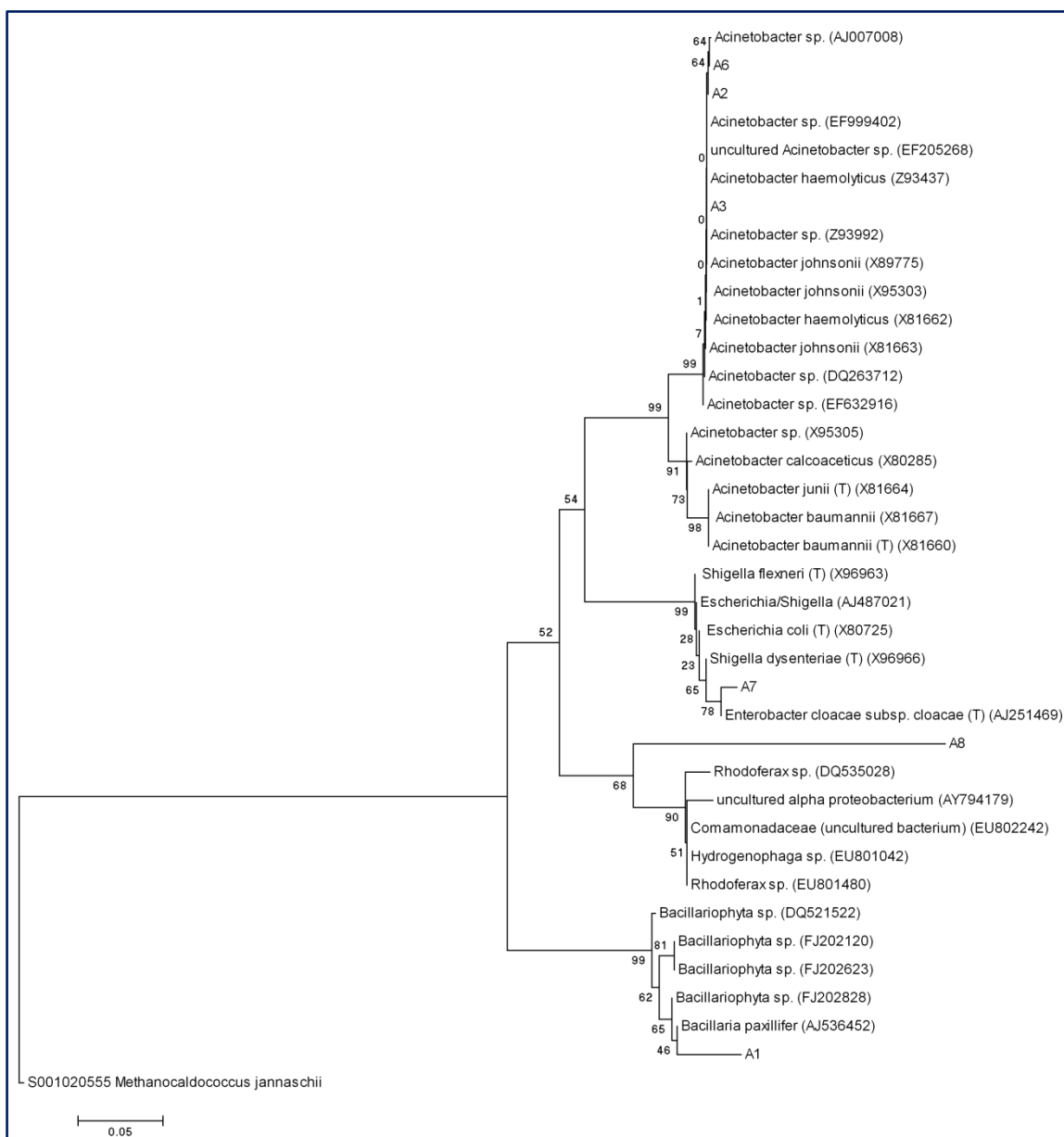
Iz slike TGGE gela je razvidno, da TGGE pri vseh vzorcih ni uspela. Bandi so se uspešno ločili le pri vzorcih 1, 2 in 7. Pri ostalih vzorcih je vidno ločevanje bandov pri dnu gela, kar pomeni, da bi bilo potrebno narediti TGGE v večjem temperaturnem razponu, da bi se vsi bandi razločno ločili med sabo. Pri vzorcih 4, 5 in 6 bandi niso vidni oziroma so prešibki, da bi jih lahko izrezali. Število bandov na posamezen vzorec je bilo največ 6, kar je zelo malo.

Od osmih vzorcev DNA, ki smo jih poslali na sekveniranje, smo dobili sedem uporabnih sekvenc, ena sekvenca (A5) je bila zaradi nizke zanesljivosti na vseh delih sekvence za nadaljnje analize neuporabna. Sekvenca A4 je bila prekratka za obdelavo in ni prikazana na drevesu sorodnosti. Drevo sorodnosti (Slika 36) prikazuje najbolj sorodne taksone našim izbranim sekvencam in sorodnost med sekvencami. Iz drevesa sorodnosti je razvidno, da sta si taksonomsko najbolj podobni sekvenci A2 in A3. Najmanj sorodni sta si sekvenci A8 in A7. Zaradi večje preglednosti so sekvence z najbolj sorodnimi taksoni zbrane v preglednici (Preglednica 4). Podana je stopnja različnosti med sekvenco in najbolj sorodnim taksonom. Za podrobnejše rezultate glej: Priloga O: Rezultati sekveniranja.

Na prvem vzorčnem mestu, to je prvo referenčno mesto (Grdi žleb pri spodnjem blatu), smo s 3% različnostjo identificirali predstavnika najbližje sorodnega vrsti *Bacillaria paxillifer*. Na drugem referenčnem mestu (Šica pod Malo Račno, vzorčno mesto 2) smo dobili tri sekvence. Sekvenca A6 kaže na prisotnost predstavnika rodu *Acinetobacter*. Sekvenca A7 je najožje sorodna vrsti *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae*. Sekvenca A8 je za 19% različna od treh taksonov: *Rhodoferax* sp., nekultivirana alfa proteobakterija in nekultivirana bakterija iz družine *Comamonadaceae*. Na sedmem vzorčnem mestu (Bičje v Brezju), smo dobili dve sekvenci. Obe sekvenci kažeta na prisotnost predstavnika rodu *Acinetobacter*.

Preglednica 5: Dobljene DNA sekvence bakterijskih združb sedimentov in sorodni taksoni. Za vsako sekvenco so navedeni trije najbolj sorodni taksoni. Stopnja različnosti 0 pomeni, da je naša sekvenca zelo sorodna sekvenci dobljenega taksona

Vzorčno mesto	Sekvenca	Sorodni taksoni	Stopnja različnosti [%]
1	A1	<i>Bacillaria paxillifer</i> (AJ536452)	3
		<i>Bacillariophyta</i> sp. (FJ202828)	3
		<i>Bacillariophyta</i> sp. (FJ202623)	4
7	A2	<i>Acinetobacter</i> sp. (EF999402)	0
		uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. (EF205268)	0
		<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (Z93437)	0
7	A3	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> (Z93437)	0
		uncultured <i>Acinetobacter</i> sp. (EF205268)	0
		<i>Acinetobacter</i> sp. (Z93992)	0
2	A6	<i>Acinetobacter</i> sp. (AJ007008)	0
		A2	0
		<i>Acinetobacter</i> sp. (EF999402)	0
2	A7	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (T) (AJ251469)	0
		<i>Shigella dysenteriae</i> (T) (X96966)	0
		<i>Escherichia coli</i> (T) (X80725)	0
2	A8	<i>Rhodoferax</i> sp. (DQ535028)	19
		uncultured alpha proteobacterium (AY794179)	19
		<i>Comamonadaceae</i> (uncultured bacterium) (EU802242)	19



Slika 36: Drevo sorodnosti DNA sekvenc bakterijskih združb sedimentov v vodotokih Grosupeljščica in Podlomščica. Števila na razvejitvah predstavljajo stopnjo različnosti za določeno število enot

## 7 DISKUSIJA

### 7.1 FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE VODE

Temperatura vode na vzorčnih mestih je bila od 5,3°C do 8,8°C. Nizke vrednosti so posledica časa v katerem smo opravljali meritve, saj je temperatura vode predvsem odraz sezonskih klimatskih sprememb (Urbanič in Toman, 2003). Razlike v temperaturi vode med vzorčnimi mesti so posledica sprememb v vrstni sestavi in sklenjenosti obrežne vegetacije. Znano je, da ima senčenje velik vpliv na temperaturo vode (MacDonald in sod., 2003; Stream visual..., 1998). Na temperaturo vode vplivajo tudi dnevno-nočne spremembe, količina vode v strugi, prisotnost potopljenih makrofitov, nadmorska višina, led in sneg, površinski dotoki in odtoki ter talna voda. Temperatura v vodotokih običajno narašča od izvira dolvodno (Wetzel, 2001). Višjo temperaturo vode na zadnjih treh vzorčnih mestih lahko delno pojasnimo tudi z iztokom komunalne čistilne naprave, saj povečana koncentracija raztopljenih organske snovi in suspendiranih delcev v vodi poveča absorbcijo sončnega sevanja (Urbanič in Toman, 2003).

To domnevo podpira tudi povišana električna prevodnost na zadnjih treh vzorčnih mestih v primerjavi z vzorčnima mestoma 7 in 8, ki se nahajata pred iztokom. Električna prevodnost je znašala od 480  $\mu\text{S}/\text{cm}$  do 583  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Izmerjene vrednosti električne prevodnosti so nekoliko višje, saj v jesenskem času, ko smo opravili meritve, poteka intenzivna razgradnja odpadlega listja, bioprodukcija pa je zaradi nizkih temperatur in intenzitete svetlobe nizka. Z zadnjimi tremi vzorčnimi mesti so primerljive vrednosti v Grosupeljščici (vzorčna mesta od 3 do 6), kar je verjetno posledica urbanega zaledja, saj se s povečanjem nabitih delcev v vodi poveča tudi električna prevodnost (Urbanič in Toman, 2003).

Temperatura vode vpliva na koncentracijo kisika v vodi in nasičenost vode s kisikom. Topnost kisika je večja pri nižjih temperaturah vode. Na koncentracijo kisika vplivajo tudi atmosferski tlak, slanost, turbulenca ter fotosintezna in respiratorna aktivnost v vodi (Wetzel, 2001; Wilcock in Nagels, 2001 cit. po Odum, 1956). Izmerjene koncentracije kisika so bile od 6,1 mg/L do 9,7 mg/L. Glede na odvisnost med temperaturo vode in topnostjo kisika v njej so te koncentracije nizke (Wetzel, 2001). To lahko pojasnimo z nizko fotosintezno aktivnostjo makrofitov v jesenskem času. Najvišje so bile koncentracije

v Grosupeljščici, kjer je vodni tok hitrejši in povzroča večjo turbulenco, ki povečuje koncentracijo kisika v vodi (Urbanič in Toman, 2003). Nizke koncentracije kisika na zadnjih treh vzorčnih mestih kažejo na obremenitev Podlomščice zaradi vtoka komunalne čistilne naprave. Koncentracije kisika so namreč nižje na mestih izpustov odpadnih voda, bogatih z organskimi snovmi. Vrednosti nasičenosti vode s kisikom so odraz vrednosti koncentracije kisika. Nasičenost vode s kisikom je poleg temperature odvisna tudi od zračnega tlaka in koncentracije ionov. Vrednosti so nizke, pod 100% in nakazujejo višjo respiratorno aktivnost od fotosintetske (Urbanič in Toman, 2003). Na vzorčnih mestih od 7 do 11 je nasičenost s kisikom zelo nizka (od 68,7 do 52,7%), še dodatno se zniža po iztoku komunalne čistilne naprave.

Vrednosti pH so bile nevtralne do bazične in na vseh vzorčnih mestih podobne, od pH 7 do 8. Te vrednosti so v pH območju večine naravnih voda (Urbanič in Toman, 2003). Rezultati vsebnosti nitratnih in fosfatnih ionov so delno v skladu s pričakovanji. Vrednosti nitratov so bile povišane na vseh vzorčnih mestih, razen na prvem referenčnem mestu in so znašale od 2 do 6 mg/L. Te vrednosti kažejo na spiranje iz gnojnih kmetijskih površin, ki se nahajajo v zaledju preučevanih vodotokov, na vzorčnih mestih od 4 do 6 pa potok Grosupeljščica teče preko urbanih površin. Na zadnjih treh vzorčnih mestih, od iztoka komunalne čistilne naprave dolvodno, bi pričakovali vrednosti nad 10 mg/L, ki so značilne za prisotnost odpadnih komunalnih voda (Urbanič in Toman, 2003). Kljub temu je bila vsebnost nitratov na teh mestih zgolj od 3 do 5 mg/L. Pri vsebnosti fosfatov je vidna razlika pred in po iztoku komunalne čistilne naprave, saj se vrednosti dvignejo od 0 mg/L na vzorčnih mestih 7 in 8 pred vtokom na 0,3 do 0,4 mg/L na mestih od iztoka dolvodno. Vsebnosti fosfatov so višje od 0,1 mg/L na kar sedmih vzorčnih mestih, kar kaže na obremenjenost vodotokov s hranili. To lahko delno pojasnimo z zaledjem, saj spiranje iz kmetijskih površin prispeva k povišanim koncentracijam fosfatov (Wetzel, 2001; Gücker in Pusch, 2006). Morda so koncentracije delno povišane tudi zaradi odsotnosti makrofitov v času opravljanja meritev, saj vodne rastline v vegetacijski sezoni intenzivno privzemajo fosfor iz vode (Schulz in Köhler, 2006; Urbanič in Toman, 2003). Presenečajo zelo visoke koncentracije fosfatov na vzorčnih mestih 4 (0,8 mg/L) in 6 (0,6 mg/L), medtem ko je na mestu 5 koncentracija 0 mg/L. Tu gre najverjetneje za napako pri opravljanju meritev, visoko vsebnost fosfatov na mestu 4 pa bi lahko pojasnili z iztokom iz industrijske cone v

Jerovi vasi. Rezultati fizikalnih in kemijskih meritev jasno kažejo na problematiko iztoka komunalne čistilne naprave Grosuplje, kar potrjuje tudi Monitoring stanja površinskih in pitnih vod v občini Grosuplje (2007, 2008), ki ga izvaja Inštitut za fizikalno biologijo. Monitoring stanja površinskih in pitnih vod v občini Grosuplje (2008) kaže na neobremenjenost Podlomščice na izvira, z izjemo rahlo povišane vsebnosti nitratov. Rezultati kažejo na zmerno obremenitev preučevanih vodotokov s hranili in povečano organsko obremenitev Podlomščice od komunalne čistilne naprave dolvodno.

## 7.2 MAKROFITI

### 7.2.1 Grosupeljščica

V potoku Grosupeljščica smo zabeležili 15 taksonov. Vrstna pestrost je dosti nižja kot v Podlomščici, kar pripisujem predvsem substratu. Znano je namreč, da potoki na karbonatni podlagi vsebujejo malo hranil (Haslam, 2006). Grosupeljščica v zgornjem delu toka (pod imenom Veliki potok) teče po karbonatni podlagi, v ravninskem delu pa je v substratu prisotna tudi glina (Meze in sod., 1980) in tu se vrstna pestrost makrofitov močno poveča. Poleg substrata imata velik vpliv tudi regulacija in zaledje. Grosupeljščica namreč v drugem delu teče skozi mesto Grosuplje, v tretjem delu pa preko kmetijskih površin, kjer se zaradi spiranja le-teh še dodatno povečuje obremenjenost s hranili (Gücker in Pusch, 2006). Na drugem in tretjem delu je vodotok v celoti reguliran. Vse to se odraža v razliki v številu taksonov med posameznimi deli vodotoka.

Na prvem delu potoka, pred Jerovo vasjo, uspeva samo mah *Fontinalis antipyretica*, ki je tudi edina gorvodno prisotna vrsta. Tu se kaže prej opisan vpliv karbonatne podlage in tudi hitrejšega toka gorvodno.

Za drugi del potoka, sta značilni vrsti *Myriophyllum spicatum* in *Potamogeton crispus*. Njuna pogostost v kombinaciji s pojavljanjem nekaterih drugih vrst kaže na habitat s srednjo do visoko vsebnostjo hranil (Haslam, 2006). Znano je, da evtrofni potencial v vodotokih običajno narašča od izvira dolvodno (Haslam, 2006), vendar drastično spremembo trofičnega potenciala pripisujem iztoku v Jerovi vasi.

V zadnjem delu Grosupeljščice je vrstna pestrost največja. Značilne vrste so: *Phalaris arundinacea*, *Sparganium erectum* agg., *Lythrum salicaria* in *Berula erecta*. Povečanje vrstne pestrosti pripisujem šibkemu senčenju vodotoka in pa dejstvu, da je sedimenta tu več. Prevladuje finejši sediment in rastline se lažje zakoreninijo kot na prodnatem in peščenem substratu (Haslam, 2006).

Kljub temu, da ima regulacija vodotokov negativen vpliv na vrstno diverziteto (Pedersen in sod., 2007), na primeru Grosupeljščice to ni vidno. Tu imajo največji vpliv na vrstno diverziteto substrat ter zaledje in iztok, ki vplivata na povečanje vsebnosti hranil v vodi in imata, obratno kot v Podlomščici, za posledico povečanje diverzitete.

### 7.2.2 Podlomščica

V potoku Podlomščica smo popisali 28 taksonov. V povirnem delu in drugemu delu vodotoka je vrstna pestrost razmeroma visoka. Število taksonov na posameznih odsekih v zgornjem delu, kjer potok teče skozi gozd in prek travnikov, variira predvsem na račun različnega senčenja. Svetloba namreč pomembno vpliva na kompozicijo in biomaso makrofitov (Hrivnák in sod., 2006). Makrofiti so v močno senčenih vodotokih, ki tečejo skozi gozd, večinoma odsotni (Mackay in Marsh, 2005). Značilni vrsti prvega dela potoka sta mahova *F. antipyretica* in *Brachythecium rivulare*. Mahovi najbolje rastejo na grobem substratu (Haslam, 2006; Hrivnák in sod., 2006) in se v Podlomščici pojavljajo samo v povirnem delu, kjer je substrat bolj kamnit in prodnat. Na izviru uspeva tudi navadna vodna kreša (*Nasturtium officinale*), ki je značilna za čiste studence (Martinčič in sod., 1999).

Za drugi del potoka so značilne vrste: *Alisma-plantago aquatica*, *Callitriche* sp., *Equisetum arvense*, *Mentha aquatica*, *Mentha longifolia*, *Myosotis scorpioides* in *Nuphar luteum*. Gre za značilno združbo vodotokov na glineni podlagi (Haslam, 2006), med katere sodi tudi Podlomščica. Večina vrst, ki smo jih našli v Podlomščici, je značilno korelirana z zanemarljivim in počasnim tokom ter posledično s finim, muljastim substratom (Haslam, 2006). Kljub prisotnosti vrst, ki uspevajo v vodotokih z visoko vsebnostjo hranil, na nekaterih odsekih, vrstna sestava kaže na vodno okolje s srednjo vsebnostjo hranil. Vrste značilne za vodotoke z visoko vsebnostjo hranil, kot sta na primer *N. luteum* in *A. plantago-*

*aquatica* se pojavljajo na odsekih skupaj z vrstami značilnimi za vode manj bogate s hranili, kot je na primer *Ranunculus trichophyllus*, ki je značilna za čiste vodotoke s srednjo vsebnostjo hranil (Haslam, 2006). Poleg tega je pojavljanje vrst značilnih za vode z visoko vsebnostjo hranil v zgornjem delu vodotoka značilna za vodotoke na glineni podlagi, ki so najbogatejši z nutrienti (Haslam, 2006).

V zadnjem delu vodotoka se vrstna sestava drastično spremeni, viden je tudi trend zmanjševanja števila taksonov na posameznem odseku. Značilne vrste tretjega dela Podlomščice so *Phragmites australis*, *Potamogeton nodosus* in *P. arundinacea*. Vodotok je reguliran in lesna obrežna vegetacija je večinoma povsem odsotna. Zmanjšana pestrost mikrohabitatov in izpostavljenost sončnemu sevanju se tu kaže v dominanci ene vrste (*P. australis*). Vrsta značilno dominira v plitvih jarkih z visoko vsebnostjo hranil (Haslam, 2006), kakršna je Podlomščica v tretjem delu do komunalne čistilne naprave. Tu se pojavljata tudi *S. erectum* agg. in *Typha latifolia*, ki sta značilni vrsti plitvih nižinskih glinenih vodotokov (Haslam, 2006).

Od iztoka komunalne čistilne naprave Grosuplje (KČN) dolvodno se dominanca vrst zopet spremeni. Prevladujoči vrsti sta *P. arundinacea* in *P. nodosus*. Prva je značilna za glinene zamuljene vodotoke (Haslam, 2006), *P. nodosus* pa dobro uspeva v vodah bogatih z nutrienti (Hrivnák in sod., 2006) in ima od KČN dolvodno najvišji povprečni masni indeks vrste. Upoštevati moramo tudi spremembo morfoloških značilnosti vodotoka, saj se na tem mestu struga poglobi in potok je zaradi pritoka Bičja bolj vodnat. Določene vrste, na primer *T. latifolia* pa ne morejo uspevati v globoki vodi (Haslam, 2006). Nizko vrstno diverziteto v tem delu lahko pripišemo KČN. O vplivu onesnaženja lahko govorimo, ko je na nekem mestu odsotnih polovica ali več vrst, ki bi sicer uspevale v določenem habitatu in nekatere prisotne vrste slabše rastejo (Haslam, 2006; Gücker in Pusch, 2006). Na odseku neposredno za iztokom KČN v Podlomščici uspeva samo ena vrsta in sicer *P. australis*, za katero je znano, da dobro uspeva v s hranili bogatih vodah (Haslam, 2006).

Na zadnjih dveh odsekih potok ni več reguliran in več je obrežne vegetacije. Kljub temu je na odseku pred zlitjem z Grosupeljščico diverziteta zelo nizka. Šele na zadnjem odseku, po zlitju z Grosupeljščico je dominanca zopet mešana. Tu se pojavita dve vrsti iz



Grosupeljščice: *M. spicatum* in *Potamogeton pectinatus* ter *Elodea canadensis*, ki gorvodno ni bila zastopana v nobenem potoku in preferira evτροφne habitate (Haslam, 2006). Pogostost posameznih vrst je velika, kar kaže na visoko vsebnost hranil v vodi (Stream visual..., 1998). *P. pectinatus* je v zadnjem odseku močno zastopan, kar je razvidno tudi iz velikega povprečnega masnega indeksa vrste. Tudi nitaste zelene alge so pogoste. Omenjena taksona sta najbolj tolerantna na onesnaženje. Če je vodotok močno onesnažen, v njem uspeva le *P. pectinatus* ali nitaste zelene alge, ali pa je prisotnih malo vrst od katerih prevladuje *P. pectinatus* (Haslam, 2006). Rezultati torej kažejo na veliko organsko obremenitev vodotoka, vendar pa stanje ni kritično. Na pojavljanje in pogostost makrofitov v Podlomščici ima človekovo poseganje v okolje velik negativen vpliv in sicer z regulacijo struge in spuščanjem efluentov iz KČN.

### 7.3 ŠIRŠA OKOLJSKA OCENA VODOTOKOV

Prvi del Grosupeljščice, glede na pojavljanje in pogostost makrofitov, predstavlja prvi odsek pred Jerovo vasjo, ki spada v tretji RCE kakovostni razred. Drugi del vodotoka (odseki 2-4) spada v najslabši, peti kakovostni razred. V tem delu je Grosupeljščica kanalizirana in teče skozi mesto Grosuplje. Odseki v zadnjem delu vodotoka (5-10) spadajo v peti in četrti kakovostni razred. Vodotok je v tem delu kanaliziran oziroma, od Grosuplja dolvodno, reguliran. Na slab rezultat ima največji vpliv prav dejstvo, da je potok reguliran oziroma kanaliziran. Na račun tega po RCE metodi (Petersen, 1992) vodotok doseže najnižje ali nizko število točk pri več trditvah. Na kakovost vodnega habitata pomembno vplivata tudi obrežna vegetacija in zaledje (Wilcock in Nagels, 2001). Ker so v zaledju gnojene travniki, mešane kmetijske površine in urbane površine, je spiranje hranil v vodotok veliko, kar ima negativen vpliv na kakovost vodotoka (Gücker in Pusch, 2006; Hrivnák in sod., 2006). Obrežna vegetacija je nesklenjena, lesnate vegetacije skorajda ni, na večini odsekov prevladujejo trave. Obrežni pas predstavlja blažilni pas, saj rastline obrežnega pasu s privzemanjem hranil iz tal blažijo vplive zaledja in preprečujejo erozijo (Bouldin in sod., 2004; Stream visual..., 1998). Širina obrežnega pasu Grosupeljščice pa je majhna, večinoma od 1 do 5 m, kar prispeva k slabši kakovosti vodnega okolja. Iz rezultatov sledi, da je v celotnem nižinskem delu vodotoka potrebna reorganizacija struge in blaženje učinkov iz zaledja (Petersen, 1992).

Prvi del Podlomščice, glede na pojavljanje in pogostost makrofitov, predstavljata prva dva odseka struge, ki spadata v prvi in tretji RCE kakovostni razred. Že fizikalno-kemijske analize in združba makrofitov na izviri kažeta na odlično stanje vodnega okolja, ki ga rezultati RCE metode potrjujejo. Slab rezultat RCE analize na drugem odseku je posledica regulacije vodotoka na tem mestu. Drugi del vodotoka (odseki 3-14) spada pretežno v drugi RCE kakovostni razred. Potok ima na tem delu razmeroma dobro ohranjeno naravno strugo, obrežna vegetacija je pretežno lesnata, sklenjena in obrežni pas je širok. Odlaganje usedlin je majhno, detrit gradita pretežno listje in les. Petersen (1992) za drugi kakovostni razred priporoča le spremembe na posameznih odsekih. Odseki 12-14, kjer potok pride v nižino, spadajo v tretji kakovostni razred. Tu je struga že regulirana, v zaledju se pojavijo travniki in mešane kmetijske površine, več je finega detrita in usedlin in obrežni pas je ožji. Na tem delu vodotoka so potrebne manjše spremembe vzdolž večjega dela struge (Petersen, 1992). Tretji, nižinski del vodotoka (odseki od 15 naprej) spada v četrti in peti kakovostni razred, z izjemo zadnjih dveh odsekov, ki spadata v tretji kakovostni razred. Slab rezultat je podobno kot pri Grosupeljščici predvsem posledica regulacije, nesklenjene in pretežno zelnote obrežne vegetacije, ozkega obrežnega pasu, povečane količine usedlin in finega detrita v strugi in zaledja. V zaledju so travniki in mešane kmetijske površine. Odsek 18, takoj za KČN, spada v najslabši RCE kakovostni razred. Tudi tu Petersen (1992) priporoča reorganizacijo struge in blaženje učinkov iz zaledja.

#### 7.4 BAKTERIJSKE ZDRUŽBE SEDIMENTOV

Različni vzorci bandov na vzorčnih mestih 1, 2 in 7, kažejo na različne bakterijske združbe na posameznih mestih. Ker sta vzorčni mesti 1 in 2 referenčni, bi vzorci bandov z ostalih mest pokazali ali se združba vzdolž vodotokov spreminja in kako se spreminja. Sprememba vzorca bandov namreč pomeni spremembo v bakterijski združbi, kar posredno kaže na spremembe v okolju (Kostanjšek in sod., 2005). Tako bi lahko ugotavljali onesnaženje preučevanih vodotokov. Majhno število bandov na vzorec kaže na nizko vrstno diverziteto, vendar število bandov ne predstavlja nujno števila taksonov (Beier in sod., 2008). Dejstvo je tudi, da en band ne pomeni enega taksona, saj se sekvenira le najpogostejši takson v bandu (Kostanjšek in sod., 2005).

Na podlagi dobljenih rezultatov ne moremo sklepati na kakovost vodotokov, saj smo uspešno identificirali premalo taksonov, pričakovali smo uspešnejšo identifikacijo. Taksoni, ki smo jih identificirali, ne kažejo na posebne razmere v sedimentih ozeroma na onesnaženje. Preseneča le prisotnost predstavnika enterobakterij na referenčnem mestu (vzorčno mesto 2), ki kaže na prisotnost fekalij (Madigan in Martinko, 2006). Vrste rodu *Acinetobacter* so splošno razširjene v naravi, preživijo na različnih vlažnih in suhih površinah in so pomembni mikroorganizmi v tleh (<http://en.wikipedia.org/wiki/Acinetobacter>). Na sedmem vzorčnem mestu obe sekvenci kažeta na predstavnika rodu *Acinetobacter*. Lahko da gre res za dva različna predstavnika istega rodu, lahko pa da gre za istega, saj sta si sekvenci zelo ozko sorodni. Možno je, da smo napačno presodili, da gre na TGGE gelu za dva različna banda.

Spremembo v strukturi bakterijske združbe smo pričakovali od iztoka iz komunalne čistilne naprave dolvodno, saj velika količina organske snovi v iztoku predstavlja hranila bakterijam (Findlay in sod., 1993; Muylaert in sod., 2002), vpliva pa tudi na kemijske pogoje. Večjo vrstno pestrost smo pričakovali v Podlomščici kot v Grosupeljščici, kjer je sediment pretežno peščen. V Podlomščici so sedimenti glineni in bakterije imajo na voljo večjo površino za naselitev (Santmire in Leff, 2007). V glinenih sedimentih je tudi več hranil kot v peščenih (Haslam, 2006). Pričakovali bi podobne združbe na vzorčnih mestih znotraj posameznega vodotoka, saj so, kot poroča Beier s sod. (2008), v podobnih habitatih podobne bakterijske združbe. Opaža tudi razlike v smeri od izvira dolvodno. Večja ko je razdalja med vzorčnimi mesti, večja je razlika v kompoziciji združbe.

Razlog za dobljen rezultat je najverjetneje dolg postopek od odvzema vzorcev do sekveniranja. Kompleksnost laboratorijskega dela in raba različnih molekularnih tehnik imata za posledico večji vpliv človeškega faktorja, saj se poveča možnost za večje število napak pri delu. Morda bi bilo bolje uporabiti DGGE (denaturirajoča gradientna gelska elektroforeza) namesto TGGE (temperaturno gradientna gelska elektroforeza). Več avtorjev navaja uporabo DGGE kot učinkovito metodo pri določanju kompozicije bakterijskih združb (Lawrence in sod., 2004; Leff in sod., 2005; Muylaert in sod., 2002; Winter in sod., 2007). TGGE je prav tako uporabna metoda za določanje taksonomske sestave bakterijskih združb, vendar se pojavlja predvsem v študijah, kjer preučujejo

sezonsko dinamiko bakterijskih združb (Beier in sod., 2008; Kostanjšek in sod., 2005; Nübel in sod., 1996; Pesce in sod., 2008). Prednost TGGE je ta, da je manj zahtevna in jo opravimo v krajšem času kot DGGE (Kostanjšek in sod., 2005). Menim, da ima preučevanje bakterijskih združb sedimentov potencial za določanje stanja vodnega okolja. Predlagam nadaljnje raziskave bakterijskih združb, optimizacijo odvzema vzorcev in molekularnih metod. Koristne bi bile tudi fizikalno-kemijske analize sedimentov, saj v sedimentih vladajo drugačne razmere kot v prosti vodi nad njimi (Wetzel, 2001).

Interpretacija stanja vodnega habitata na podlagi makrofitov je zelo kompleksna. Upoštevati moramo veliko različnih dejavnikov, ki vplivajo na njihovo pojavljanje in pogostost (Kelly in Whitton, 1998). Tudi na diverziteti bakterijske združbe sedimentov poleg polucije vplivajo še drugi okoljski dejavniki (Kostanjšek in sod., 2005, cit. po Atlas s sod., 1991). Prav ta nuja po dobrem poznavanju okoljskih dejavnikov pa je pomanjkljivost pred nekaterimi drugimi metodami. Meritve fizikalnih in kemijskih parametrov so sicer preprostejše, vendar odražajo le trenutno stanje, medtem ko makrofiti in bakterijske združbe lahko pokažejo na dolgotrajne spremembe, na primer kronično obremenitev vodotoka. Strukturni odzivi makrofitskih združb se pojavijo nekaj let ([http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www\\_en51/en51e\\_pdf/en51e\\_pet.pdf](http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www_en51/en51e_pdf/en51e_pet.pdf)), bakterijskih združb pa nekaj tednov po onesnaženju (Tlili in sod., 2008). Prednost določanja stanja na podlagi makrofitov sta preprosto določanje vrst in nemobilnost rastlin (Shimshon in sod., 2005). Dovolj je, da jih popišemo enkrat na tri leta, medtem ko moramo fizikalno-kemijske meritve opravljati pogosteje, na tri mesece (Program spremljanja..., 2009). Določanje stanja na podlagi bakterijskih združb bi bilo prav tako priporočljivo opravljati enkrat v vsakem letnem času, zaradi sezonske dinamike, saj se bakterijske združbe na spremembe v okolju odzovejo hitreje kot makrofiti.

## 8 SKLEPI

*"Pojavile se bodo razlike v prisotnosti in pogostosti makrofitov vzdolž posameznih vodotokov in med obema vodotokoma. Vrstna sestava in zastopanost posameznih vrst se bo v Podlomščici spremenila za iztokom iz komunalne čistilne naprave Grosuplje, vplivi pa se bodo kazali dolvodno."*

Rezultati potrjujejo prvo hipotezo. Pojavljajo se razlike v prisotnosti vrst in pogostosti pojavljanja makrofitov vzdolž posameznih vodotokov in med obema vodotokoma. Sprememba v pojavljanju in pogostosti makrofitskih taksonov je predvsem posledica sprememb v obliki struge, vegetaciji obrežnega pasu, dna vodotoka in količini hranil. Vrstna sestava in zastopanost posameznih vrst makrofitov se v Podlomščici spremeni za iztokom iz komunalne čistilne naprave Grosuplje. Vplivi organske obremenitve so vidni tudi dolvodno.

*"Na različnih delih vodotokov se bodo pojavljale različne bakterijske združbe sedimentov. V Podlomščici bodo neposredno za iztokom iz komunalne čistilne naprave združbe značilne za močno obremenjene vode, vplivi pa se bodo kazali dolvodno."*

Pojavljanja različnih bakterijskih združb sedimentov na različnih delih vodotokov zaradi pomanjkljivih rezultatov ne moremo potrditi, kljub temu, da so vidne razlike v sestavi bakterijskih združb na treh vzorčnih mestih. Prav tako ne moremo potrditi prisotnosti združb značilnih za močno obremenjene vode neposredno za iztokom iz komunalne čistilne naprave in dolvodno.

*"Predvidevamo, da se bodo bakterijske združbe v sedimentih in združba makrofitov spreminjali glede na dejavnike okolja."*

Tretjo hipotezo smo delno potrdili. Dejavniki okolja vplivajo na kompozicijo makrofitske združbe. Zaradi pomanjkljivih rezultatov analize bakterijskih združb sedimentov, povezave med dejavniki okolja in kompozicijo bakterijske združbe nismo mogli ugotoviti.

*"Predvidevamo, da bo Grosupeljščica po celotni pregledani dolžini vodotoka spadala v nizek RCE kakovostni razred, predvsem na račun zaledja in regulacije struge."*

*Predvidevamo, da bo Podlomščica v zgornjem delu toka spadala v višji RCE klakovostni razred, kot v spodnjem delu, predvsem zaradi spremembe zaledja in morfologije struge."*

Rezultati potrjujejo četrto hipotezo. Grosupeljščica je po celotni pregledani dolžini potoka regulirana in obremenjena s hranili, kar je posledica kmetijskega in urbanega zaledja. V spodnjem delu z izjemo prvega odseka spada v peti, zadnji trije odseki pa v četrti RCE kakovostni razred.

Potok Podlomščica je od izvira do nižinskega dela toka neonesnažen, naravna struga je dobro ohranjena. Po metodi RCE spada v prvi in drugi kakovostni razred. V spodnjem delu toka je delno regulirana in obremenjena s hranili, kar je posledica kmetijskih površin v zaledju in iztoka iz komunalne čistilne naprave Grosuplje. Po metodi RCE spadajo odseki v spodnjem delu v tretji, četrti in peti kakovostni razred.

## 9 POVZETEK

Preučevali smo pojavljanje in razporeditev makrofitov v potokih Grosupeljščica in Podlomščica ter sestavo bakterijskih združb sedimentov v obeh vodotokih z namenom, da ugotovimo stanje obeh vodotokov. Zanimala nas je tudi povezava med okoljskimi dejavniki in pojavljanjem makrofitov. Za pomoč pri interpretaciji smo opravili tudi fizikalne in kemijske meritve, oceno habitata in širšo okoljsko oceno.

V rastnih sezonah 2007 in 2008 smo vzdolž obeh vodotokov izvedli popis makrofitov, ocenili njihovo pogostost po 5 stopenjski lestvici in določili njihove rastne oblike. Naredili smo širšo okoljsko oceno po metodi RCE (Petersen, 1992) in oceno habitatnih parametrov (Janauer, 2002). Dne 14.11. 2007 smo na terenu opravili meritve temperature vode, koncentracije kisika v vodi, nasičenosti vode s kisikom in električne prevodnosti. Odvzeli smo vzorce sedimentov za analizo bakterijskih združb in vodne vzorce za analize kemijskih parametrov v laboratoriju (pH, vsebnost nitratov in fosfatov). V laboratoriju smo izolirali DNA iz vzorcev sedimentov, jo pomnožili s pomočjo PCR, dobljene vzorce dali na TGGE in ustrezno pomnoženo DNA izrezanih bandov poslali na sekveniranje. Zbrane podatke smo obdelali z ustreznimi računalniškimi programi.

Rezultati fizikalnih in kemijskih meritev vode so pokazali obremenjenost obeh vodotokov z orto- fosfati, kar je posledica spiranja kmetijskih površin v zaledju. Podlomščico močno obremenjuje iztok iz komunalne čistilne naprave Grosuplje, na kar kažejo tudi zelo nizke koncentracije kisika v vodi od iztoka dolvodno. Skupno smo popisali 31 makrofitskih taksonov. V Grosupeljščici smo popisali 15, v Podlomščici pa 28 taksonov. Na pojavljanje in razporeditev makrofitov močno vplivajo spodjedanje brega, detrit, oblika struge in vegetacija obrežnega pasu pa tudi dno vodotoka in količina hranil. V Podlomščici imata negativen vpliv na vrstno pestrost regulacija in iztok iz komunalne čistilne naprave. V Grosupeljščici imata povečan vnos hranil v vodotok in finejši substrat v nižinskem delu vodotoka za posledico večjo vrstno pestrost. Na podlagi pojavljanja in razporeditve makrofitov spada Grosupeljščica v prvem delu med vodotoke z nizko vsebnostjo hranil, v drugem in tretjem delu pa med vodotoke s srednjo do visoko vsebnostjo hranil. Podlomščica spada v prvem in v drugem delu med vodotoke s srednjo, v tretjem delu pa med vodotoke z visoko vsebnostjo hranil. Grosupeljščica spada z izjemo prvega odseka v

peti RCE kakovostni razred, zadnji trije odseki pa v četrti RCE kakovostni razred. Za celoten nižinski del potoka je priporočena reorganizacija struge in blaženje učinkov iz zaledja. Podlomščica spada od izvira do nižinskega dela po metodi RCE v prvi in drugi kakovostni razred. V nižinskem delu spadajo odseki v tretji, četrti in peti RCE kakovostni razred. Tudi tu je potrebna reorganizacija struge in blaženje učinkov iz zaledja. Tako v Grosupeljščici kot v Podlomščici imajo največji negativni vpliv na vodno okolje regulacija oziroma kanalizacija vodotoka, neskljenjena in pretežno zelnata obrežna vegetacija, ozek obrežni pas ter kmetijske oziroma urbane površine v zaledju. Rezultati analize bakterijskih združb sedimentov so bili pomanjkljivi, zato ne moremo sklepati na stanje vodnega okolja na podlagi taksonomske sestave bakterijskih združb.

Za vrednotenje izbranih vodotokov smo izbrali makrofite in bakterijske združbe, ki so elementi biološkega vrednotenja vodotokov. Prednost obeh je, da odražajo stanje v daljšem časovnem obdobju. Makrofiti se na spremembe v vodnem okolju odzovejo v času nekaj let, bakterije pa v nekaj tednih. Pomanjkljivost obeh je nujno dobro poznavanje okoljskih dejavnikov. Dodatna pomanjkljivost vrednotenja na podlagi bakterijskih združb je serija molekularnih tehnik, ki zahtevajo več časa kot vrednotenje na podlagi makrofitov in povečujejo možnost napak pri delu, te pa imajo za posledico manj zanesljive rezultate.



## 10 VIRI

Balanson S., Walton B.M., Wolin J.A., Mal T.K. 2005. Aquatic Macrophyte Diversity and Habitat Characterization in Cuyahoga River Watershed in Northeastern Ohio. *Ohio Journal of Science*, 105, 4: 88-96

Beier S., Witzel K.P., Marxen J. 2008. Bacterial Community Composition in Central European Running Waters Examined by Temperature Gradient Gel Electrophoresis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. 2008. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 1: 188-199

Bott T.L., Kaplan L.A. 1985. Bacterial Biomass, Metabolic State, and Activity in Stream Sediments: Relation to Environmental Variables and Multiple Assay Comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 2: 508-522

Bouldin J.L., Farris J.L., Moore M.T., Cooper C.M. 2004. Vegetative and structural characteristics of agricultural drainages in the Mississippi Delta landscapes. *Environmental Pollution* 132: 403-411

Chambers P.A., Lacoul P., Murphy K.J., Thomaz S.M. 2008. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 9-26

Chénier M.R., Beaumier D., Fortin N., Roy R., Driscoll B.T., Lawrence J.R., Greer C.W. 2006. Influence of Nutrient Inputs, Hexadecane, and Temporal Variations on Denitrification and Community Composition of River Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1: 575-584

CORINE (Coordination of information on the environment) programme of the Commission of the European Communities (Official Journal L 176, 6.7.1985). 1985. Commission of the European Communities, <http://www.reports.eea.int/COR0-part1/en/landcover1.pdf>. (19.11.2007)

Findlay S., Strayer D., Goumbala C., Gould K. 1993. Metabolism of streamwater dissolved organic carbon in the shallow hyporeic zone. *Limnology and Oceanography*, 38, 7: 1493-1499

Fortner S.L., White D.S. 1988. Interstitial water patterns: a factor influencing the distributions of some lotic aquatic vascular macrophytes. *Aquatic Botany* 31: 1-12

Gao X., Olapade O.A., Leff L. 2005. Comparison of benthic bacterial community composition in nine streams. *Aquatic Microbial Ecology* 40: 51-60

Germ M., Gaberščik A., Dolinšek M. 2003. Macrophytes of River Ižica-comparison of species composition and abundance in the years 1996-2000. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 147/1-2: 181-193

Greenaway M. 2006. Interim Report: Macrophytes in Moggill Creek and Bridgewater Creek Wetland. Moreton Bay Waterways & Catchments Partnership: 13 str.

Gücker B., Brauns M., Pusch M.T. 2006. Effects of wastewater treatment plant discharge on ecosystem structure and function in lowland streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 25, 2: 313-329

Gücker B., Pusch M.T. 2006. Regulation of nutrient uptake in eutrophic lowland streams. *Limnology and Oceanography*, 51, 3: 1443-1453

Hernandez M.E., Mitsch W.J. Deepwater macrophytes and water quality in two experimental constructed wetlands at Olentangy River Wetland Research Park. 2002. The Ohio State University. <https://kb.osu.edu/dspace/handle/1811/85> (19.11.2007)

Hrivnák R., Otáhal'ová H., Jarolímek I. 2006. Diversity of aquatic macrophytes in relation to environmental factors in the Slatina river (Slovakia). *Biologia. Bratislava*, 61, 4: 413-419

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

[http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_polymerase](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_polymerase)

[http://en.wikipedia.org/wiki/16S\\_ribosomal\\_RN](http://en.wikipedia.org/wiki/16S_ribosomal_RN)

<http://en.wikipedia.org/wiki/PCR>

[http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_sequencing](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing)

<http://rdp.cme.msu.edu/>

[http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www\\_en51/en51e\\_pdf/en51e\\_pet.pdf](http://www.eawag.ch/publications/eawagnews/www_en51/en51e_pdf/en51e_pet.pdf)

<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>

<http://www.megasoftware.net/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Janauer G.A. MIDCC: Macrophyte Inventory Danube/Coridor and Catchement. Guidance on the Assessment of Aquatic Macrophytes in the River Danube, in Water Bodies of the Fluvial Corridor, and in its Tributaries. 2002. <http://www.midcc.at>. 8str. (19.11.2007)

Joniak T., Kuczyńska-Kippen N., Nagengast B. 2007. The role of aquatic macrophytes in microhabitatual transformation of physical-chemical features of small water bodies. *Hydrobiologia* 584: 101-109

Kelly M.G., Whitton B.A. 1998. Biological monitoring of eutrophication in rivers. *Hydrobiologia* 384: 55-67

Kostanjšek R., Lapanje A., Drobne D., Perović S., Perović A., Zidar P., Štrus J., Hollert H., Karaman G. 2005. Bacterial Community Structure Analyses to Assess Pollution of Water and Sediments in the Lake Shkodra/Skadar, Balkan Peninsula. *Environmental Science and Pollution Research*, 12, 6: 361-368

Lawrence J.R., Chenier M.R., Roy R., Beaumier D., Fortin N., Swerhone G.D.W., Neu T.R., Greer C.W. 2004. Microscale and Molecular Assessment of Impacts of Nickel, Nutrients, and Oxygen Level on Structure and Function of River Biofilm Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7: 4326-4339

Macdonald J.S., MacIsaac E.A., Herunter H.E. 2003. The effect of variable-retention riparian buffer zones on water temperatures in small headwater streams in sub-boreal forest ecosystems of British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research* 33: 1371-1382

Mackay S., Marsh N. The Response of Aquatic Macrophytes to Riparian Shading in a Stream Rehabilitation Site. 2005. CRC for Catchment Hydrology. <http://www.catchment.crc.org.au/pdfs/technical200505.pdf> (19.11.2007)

Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock. Biology of microorganisms. Eleventh edition. New Jersey, Pearson Education: 992 str.

Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 1999. Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk. Tretja, dopolnjena in spremenjena izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 845 str.

Meze D., Lovrenčak F., Šercelj A. 1980. Poplavna področja v Grosupeljski kotlini. Flood areas in the Grosuplje basin (Central Slovenia). *Geografski zbornik (acta geographica)* 10, 2: 40-42

Muylaert K., Van der Gucht K., Vloemans N., De Meester L., Gillis M., Vyverman W. 2002. Relationship between Bacterial Community Composition and Bottom-Up versus Top-Down Variables in Four Eutrophic Shallow Lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 10: 4740-4750

Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence Heterogenesis of Genes Encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178, 19: 5636-5643

Pall K., Janauer G.A. 1995. Die Makrophytenvegetation von Flusstauen am Beispiel der Donau zwischen Fluss-km 2552,0 und 2511,8 in der Bundesrepublik Deutschland. *Arch. Hydrobiol., Suppl.* 101, Large Rivers, 9, 2: 91-109

Palumbo A.V., Bogle M.A., Turner R.R., Elwood J.W, Mulholland P.J. 1987. Bacterial Communities in Acidic and Circumneutral Streams. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2: 337-344

Pedersen M.L., Friberg N., Skriver J., Baattrup-Pedersen A., Larsen S.E. 2007. Restoration of Skjern River and its valley: Short-term effects on river habitats, macrophytes and macroinvertebrates. *Ecological Engineering* 30: 145-156

Perko D., Orožen-Adamič M. 1998. Slovenija. Pokrajine in ljudje. Atlas Slovenije v sliki in besedi. Ljubljana, Založba Mladinska knjiga: 735 str.

Pesce S., Fajon C., Bardot C., Bonnemoy F., Portelli C., Bohatier J. 2008. Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquatic Toxicology* 86: 352-360.

Peterlin S. 2007. Radensko polje. Grosuplje, Občina Grosuplje: 25 str.

Petersen R.C. 1992. The RCE: a Riparian, Channel, and Environmental Inventory for small streams in agricultural landscape. *Freshwater Biology* 27: 25-306

Požanel J. 1962. Zahodni del občine Grosuplje. Ljubljana, Svet za šolstvo občinskega ljudskega odbora Grosuplje in Zavod za prosvetno pedagoško službo Vič

Program spremljanja ekološkega in kemijskega stanja rek. 2009.  
<http://www.arso.gov.si/vode/reke/programi/PROGRAM%20REKE%202009.pdf>  
(21.9.2009)

Santmire J., Leff L. 2007. The effect of sediment grain size on bacterial communities in streams. *J. N. Am. Benthol. Soc.*, 26, 4: 000-000

Santmire J., Leff L. 2007. The influence of stream particle size on bacterial abundance and community composition. *Aquatic Ecology*, 41, 2: 153-160

Schulz M., Köhler J. 2006. A simple model of phosphorus retention evoked by submerged macrophytes in lowland rivers. *Hydrobiologia* 563: 521-525

Scott W.A., Adamson J.K., Rollinson J., Parr T.W. 2002. Monitoring of aquatic macrophytes for detection of long-term change in river systems. *Environmental Monitoring and Assessment* 73: 131-153

Stream Visual Assessment Protocol. 1998. United States Department of Agriculture. <http://www.nrcs.usda.gov/technical/ecs/aquatic/svapfnl.pdf> (16.1.2008)

Ter Braak C.J.F. 1987. The analysis of vegetation – environment relationships by canonical correspondence analysis. *Vegetatio* 69: 69-77

Ter Braak C.J.F., Verdonschot P.F.M. 1995. Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. *Aquatic Sciences*, 57, 3: 153-187

Tlili A., Dorigo U., Montuelle B., Margoum C., Carluer N., Gouy V., Bouchez A., Bérard A. 2008. Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron. An experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquatic Toxicology* 87: 252-263

Trošt-Sedej T. 2005. *Ekologija rastlin: priročnik za vaje*. Ljubljana, Študentska založba: 81 str.

Urbanič G., Toman, M.J. 2003. *Varstvo celinskih voda*. Ljubljana, Študentska založba: 94 str.

Wetzel R.G. 2001. *Lymnology. Lake and river Ecosystems*. Third edition. San Diego, Academic press: 1006 str.

Wilcock R.J., Nagels J.W. 2001. Effects of aquatic macrophytes on physico-chemical conditions of three contrasting lowland streams: a consequence of diffuse pollution from agriculture?. *Water Science and Technology*, 43, 5: 163-168

Winter C., Hein T., Kavka G., Mach R.L., Farnleitner A.H. 2007. Longitudinal Changes in Bacterial Community Composition of the Danube River: a Whole-River Approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 2: 421-431

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svoji mentorici prof.dr. Alenki Gaberščik za strokovno pomoč in prijaznost ter recenzentu prof.dr. Mihaelu Tomanu za popravke in nasvete.

Zahvaljujem se somentorju dr. Alexisu Zrimcu, ki mi je omogočil opravljanje diplomske naloge na Inštitutu za fizikalno biologijo.

Posebna zahvala tudi dr. Jaki Razigerju in mag. Urški Kuhar za vso tehnično pomoč.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki so kakor koli prispevali k nastanku te diplomske naloge.

Hvala tudi mojim staršem za potrpežljivost in podporo tekom študija, bratu Andražu za spremstvo na terenu ter vsem sošolkam in prijateljicam, ki so me kakor koli podpirale v času študija.

## PRILOGE

### Priloga A: Slovenska različica RCE metode (Petersen, 1992)

1. Izraba tal za obrežnim pasom (v zaledju struge)	
Zaledje poraslo z gozdom in / ali močvirji	30
Mozaik košenih travnikov / pašnikov, gozdov / močvirij ter malo obdelovalnih površin	20
Obdelovalne površine, košeni travniki / pašniki, posamezne hiše	10
Prevladujejo obdelovalne površine ali strnjeno urbano območje (hiše, tovarne)	1
2. Širina obrežnega (blažilnega) <sup>1</sup> pasu (od roba vodotoka do kmetijskih površin ali naselja)	
Močviren ali z lesnatimi rastlinami porasel pas širok več kot 30 m	30
Močviren ali z lesnatimi rastlinami porasel pas širok od 5 do 30 m	20
Močviren ali z lesnatimi rastlinami porasel pas širok od 1 do 5 m	5
Močvirnih ali lesnatih rastlin ni	1
3. Sklenjenost vegetacije v obrežnem pasu	
Vegetacija obrežnega pasu brez prekinitev	30
Prekinitve vegetacije se pojavljajo v intervalih, večjih od 50 m	20
Prekinitve vegetacije se pojavljajo vsakih 50 m	5
Prekinitve pogoste, vzdolž celotne struge / obrežnega pasu ni	1
4. Vegetacija pasu 0-10 m od struge	
Več kot 90% poraščeno z nepionirskimi lesnatimi vrstami ali močvirskimi rastlinami	25
Vegetacijo sestavljajo pionirske vrste <sup>2</sup> dreves in grmov	15
Vegetacijo sestavljajo trave in posamezna drevesa ali grmi	5
Večinoma trave, posamezni grmi/tujerodne vrste <sup>3</sup> / urbane površine/vodotok kanaliziran	1
5. Zadrževalne strukture v strugi	
Skale in stara debla, trdno zasidrani v dno, ni usedlin	15
Skale in debla za katerimi se odlagajo usedline	10
Zadrževalne strukture rahlo zasidrane; ob poplavih se premikajo	5
Peščene naplavine, zadrževalnih struktur malo	1
6. Oblika struge	
Zadošča za najvišje letne pretoke, razmerje širina / globina manj kot 7	15
Redko preplavljeni bregovi, razmerje širina / globina 8 do 15	10
Poplave ob zmerni količini vode, razmerje širina/globina 15 do 25	5
Poplave pogoste, razmerje širina / globina več kot 25 / vodotok kanaliziran	1
7. Usedline v strugi	
Odlaganje usedlin majhno, na povečanje struge nima vpliva	15
Nekaj ovir iz robotih skal in prodnikov ter malo mulja	10
Ovire iz skal, peska ali muljastih naplavin pogoste	5
Struga deljena v preplete <sup>4</sup> / vodotok kanaliziran	1
8. Struktura rečnega brega	
Breg stabilen, kamnit ali čvrsto utrjen s koreninami trav, grmovja in dreves	25
Breg trden, korenine trav, grmovja in dreves ga le delno utrjujejo	15
Breg iz rahle prsti, nekoliko utrjen z redkim slojem rastlin	5
Breg nestabilen, iz rahle prsti ali peska, tok ga spodjeda / breg je umetno utrjen	1
9. Spodjedanje brega	
Ni vidno ali pa je omejeno na območja, kjer so korenine dreves	20
Samo na rečnih zavojih in zožitvah	15
Spodjedanje pogosto	5



Močno spodjedanje vzdolž struge, breg se ruši / breg je umetno utrjen 1

10. Dno vodotoka

Kamnito dno, sestavljeno iz delcev različnih velikosti z očitnimi intersticielnimi prostori 25  
Lahkogiblivo kamnito dno z malo mulja 15  
Dno iz mulja, peska in gramoza; stabilno na nekaterih mestih 5  
Dno iz rahlo sprijetega peska in mulja, kamnitega substrata ni 1

11. Pojavljanje brzic, tolmunov in meandrov

Jasno vidni, prisotni na razdaljah od 5-7 kratne širine vodotoka 25  
Nepravilno razporejeni 20  
Dolge tolmane ločujejo kratke brzice, meandrov ni 10  
Brzic, tolmunov in meandrov ni / vodotok kanaliziran 1

12. Detrit

Prevladujeta listje in les, sedimenta ni 25  
Nekaj listja in lesa ter nekaj drobnega organskega materiala, sedimenta ni 10  
Listja in lesa ni, prisotni grobi in fini organski delci, pomešani s sedimentom 5  
Fin, anaeroben sediment, brez grobih delcev 1

Vrednotenje rezultatov:

Razred	Št. točk	Ocena	Barva	Priporočena dejavnost
I	227-280	odlično	modra	Biomonitoring in zaščita obstoječega stanja -referenčna lokacija
II	173-226	zelo dobro	zelena	Potrebne so spremembe na posameznih odsekih
III	119-172	dobro	rumena	Potrebne so manjše spremembe vzdolž večjega dela struge
IV	65-118	slabo	rjava	Potrebne so večje spremembe struge in blaženje učinkov iz zaledja
V	12-64	Zelo slabo	rdeča	Potrebna je reorganizacija struge in blaženje učinkov iz zaledja

Opombe:

<sup>1</sup> obrežni pas: pas močvirske ali lesnate vegetacije, ki tvori prehod med vodnim in kopenskim ekosistemom; vodotok štiti pred vplivi iz zaledja (zadržuje snovi, ki se sperejo s kopnega - hranila, različni polutanti, ...) ter pripomore k stabilnosti bregov

<sup>2</sup> pionirske vrste: vrba, jelša, topol

<sup>3</sup> če so prisotne tujerodne vrste, si zapiši, katere

<sup>4</sup> prepleti: v strugi se pojavljajo otočki naplavin, na katerih je lahko prisotna vegetacija (vrbe, ...)

## Priloga B: Metoda popisovanja makrofitov in ocene habitata (Janauer, 2002)

### OCENA ABUNDANCE VRST S POMOČJO PETSTOPENJSKE LESTVICE:

1. Posamična
2. Redka
3. Pogosta
4. Zelo pogosta
5. Prevladujoča

### RASTNE OBLIKE RASTLINSKIH VRST:

- ap = plavajoče neukoreninjene rastline
- sp = potopljene neukoreninjene rastline
- sa = potopljene ukoreninjene rastline (s pomočjo korenin, rizoidov ali drugih pritrjevalnih organov)
- fl = plavajoče ukoreninjene rastline
- am = rastline z amfibijskim značajem (če je več na bregu – he, če pa je več v vodi – sa)
- he = močvirske rastline ali helofiti, še očitno povezane z vodnim telesom

### OCENA HABITATA:

#### 1. STRUKTURA BREGOV

- 1- veliki kamni ali kvadri, uporabljeni za stabilizacijo bregov in regulacijo reke, mega-, makro-, mesolitoral (> 6,3 cm)
- 2- prod (mikrolitoral in akal, 0,2-6,3 cm)
- 3- pesek, psamal (0,063-0,2 cm)
- 4- drobni anorganski material, pelal (< 0,063 cm)
- 41- fini, droben (položen breg)
- 42- fini, droben (strm breg)
- 5- beton ali kak drug nasipan umeten material
- 6- naplavine oz. plavajoče preproge (floating mats) ali drug organski material

#### 2. TIP SEDIMENTA

- 1- skale, mega-, makro- in mesolitoral (> 6,3 cm)
- 2- prod (mikrolitoral in akal, 0,2-6,3 cm)
- 3- pesek, psamal (0,063-0,2 cm)
- 4- drobni anorganski material, pelal (< 0,063 cm)
- 5- umeten material (beton, asfalt, ...)
- 6- detrit ali drug organski material

### 3. OCENA HITROSTI TOKA

- 1- brez toka, stoječe
- 2- počasen tok, komaj viden, do 30 cm/s
- 3- srednje hiter tok, 35-65 cm/s
- 4- hiter tok, več kot 70 cm/s

### 4. TIP ZALEDJJA

1 = umetne površine

11- urbane (pozidane) površine (11 = mesta in večja naselja, 11908 = vasi)

12- industrijske, komercialne, transportne enote (ceste, železnice, pristanišča, ladjedelnice)

13- rudniki, odlagališča, gradbišča

14- umetne, vendar ne kmetijske površine, kot npr. pokopališča, parki, igrišča (golf igrišča, gledališča na prostem)

2 = kmetijske površine

21- orne površine (tudi rastlinjaki in do 3 leta stare opuščene njive, ...)

22- trajnice (vinogradi, nasadi sadnega drevja, ribeza, topola, oljčnic, ...)

23- pašniki

24- mešane kmetijske površine

3 = gozdovi in pol-naravne površine

31- gozd

311- listopadni gozd, vključno s topolom in drugimi olistanimi lesnatimi vrstami v obrežnem pasu

312- iglasti gozd

313- mešani gozd

32- grmovje

33- odprte površine z malo ali nič vegetacije (plaže, sipine, obrežje, skale, ...)

\* = močvirja

34- celinska močvirja

411- celinski marši

43- šotna barja

5112- kanali (umetne strukture)

Priloga C1: Grosupeljščica: koordinate odsekov, njihove dolžine in datumi popisov makrofitov (za vsak odsek sta navedeni koordinati na začetku in na koncu odseka)

št. odseka	koordinate		dolžina odseka v m	datum popisa
	N	E		
1	54,73956	50,90974 ± 3m	100	18.08.2008
	54,73937	50,90895 ± 3m		
2	54,73990	50,90655 ± 4m	100	18.08.2008
	54,74008	50,90586 ± 4m		
3	54,74030	50,90494 ± 5m	100	18.08.2008
	54,74059	50,90417 ± 6m		
4	54,74248	50,90208 ± 6m	100	07.08.2008
	54,74286	50,90131 ± 3m		
5	54,74525	50,89852 ± 3m	100	07.08.2008
	54,74587	50,89795 ± 3m		
6	54,74676	50,89671 ± 3m	100	07.08.2008
	54,74703	50,89605 ± 4m		
7	54,74947	50,88962 ± 5m	100	06.08.2008
	54,74985	50,88873 ± 3m		
8	54,75047	50,88703 ± 3m	100	02.08.2008
	54,75064	50,88616 ± 3m		
9	54,74995	50,88341 ± 4m	100	02.08.2008
	54,74987	50,88230 ± 4m		
10	54,75023	50,88140 ± 4m	100	02.08.2008
	54,75036	50,88055 ± 4m		

Priloga C2: Podlomščica: koordinate odsekov, njihove dolžine in datumi popisov makrofitov (za vsak odsek sta navedeni koordinati na začetku in na koncu odseka)

št. odseka	koordinate		dolžina odseka v m	datum popisa
	N	E		
1	45,54874	14,38813 ± 10m	100	18.8.2007
	45,54877	14,38816 ± 10m		
2	45,54877	14,38816 ± 10m	100	18.8.2007
	45,54908	14,38786 ± 12m		
3	45,54908	14,38786 ± 12m	100	18.8.2007
	45,54938	14,38767 ± 7m		
4	45,54986	14,38776 ± 12m	100	24.8.2007
	45,54986	14,38806 ± 12m		
5	45,55043	14,38969 ± 7m	100	26.8.2007
	45,55063	14,39015 ± 5m		
6	45,55095	14,39062 ± 12m	100	2.9.2007
	45,55141	14,39063 ± 12m		
7	45,55193	14,39087 ± 11m	100	2.9.2007
	45,55166	14,39105 ± 11m		
8	45,55237	14,39066 ± 7m	100	3.9.2007
	45,55270	14,39091 ± 12m		
9	45,55299	14,39073 ± 9m	100	3.9.2007
	45,55349	14,39063 ± 7m		
10	45,55360	14,39094 ± 6m	100	8.9.2007
	45,55399	14,39093 ± 6m		
11	45,55399	14,39093 ± 6m	100	8.9.2007
	45,55493	14,39091 ± 7m		
12	45,55507	14,39113 ± 4m	100	8.9.2007
	45,55548	14,39147 ± 5m		
13	45,55575	14,39142 ± 7m	100	9.9.2007
	45,55625	14,39137 ± 7m		
14	45,55752	14,39142 ± 7m	100	9.9.2007
	45,55802	14,39023 ± 11m		
15	45,56169	14,38921 ± 4m	100	23.9.2007
	45,56212	14,38907 ± 4m		
16	45,56228	14,38921 ± 4m	100	23.9.2007
	45,56270	14,38894 ± 4m		
17	45,56511	14,39137 ± 4m	100	24.9.2007
	45,56512	14,39196 ± 4m		
18	45,56509	14,39232 ± 4m	100	24.9.2007
	45,56509	14,39293 ± 7m		
19	54,73733	50,88610 ± 3m	100	30.8.2008
	54,73734	50,88526 ± 3m		
20	54,74407	50,87637 ± 4m	100	30.8.2008
	54,74501	50,87607 ± 4m		
21	54,74501	50,87607 ± 4m	100	30.8.2008
	54,74646	50,87640 ± 4m		

Priloga D1: Pogostost makrofitov po posameznih odsekih vodotoka Grosupeljščica

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Alg fil	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Ber ere	0	3	0	0	1	2	2	1	0	0
Epi hir	0	2	0	1	0	1	0	0	1	1
Fon ant	4	3	4	0	1	2	0	3	2	2
Lyt sal	0	0	0	0	0	1	1	2	1	3
Men lon	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1
Myr spi	0	2	0	3	1	0	0	0	0	0
Nit sp.	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Pha aru	0	0	0	2	3	0	5	3	2	3
Pot cri	0	3	2	3	0	0	2	2	0	3
Pot pec	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Ran tri	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1
Sch lac	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
Spa ere	0	0	0	0	1	2	2	2	0	3
Ver bec	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1







Št. odseka Parameter	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Izraba tal za obrežnim pasom	10	20	10	10	10	10	10	20	20	20
Širina obrežnega pasu	5	5	5	1	1	5	5	1	5	20
Sklenjenost vegetacije	30	30	30	1	5	5	1	1	20	5
Vegetacija obrežnega pasu	15	15	15	1	1	15	1	1	25	25
Zadrževalne strukture	1	1	1	1	1	1	1	1	10	5
Oblika struge	15	15	15	15	15	15	5	10	10	10
Usedline v strugi	15	5	5	5	5	5	5	5	1	5
Struktura brega	15	25	25	5	5	15	5	5	15	15
Spodjedanje brega	20	20	20	5	5	20	5	5	15	15
Dno vodotoka	25	25	25	25	25	5	1	5	5	5
Brzice, tolmini, meandri	20	1	1	1	1	1	1	20	25	20
Detrit	10	5	5	5	5	5	1	5	5	5

### Priloga F1: Ocena habitatnih tipov vodotoka Grosupeljščica

odsek	vodni tok	sediment	breg	zaledje
1	3	3	42	2
2	3	3	42	11
3	3	3	42	11
4	3	3	42	11
5	3	6	42	24
6	3	3	41	2
7	3	6	42	24
8	3	6	42	2
9	3	6	42	24
10	3	6	42	24

### Priloga F2: Ocena habitatnih tipov vodotoka Podlomščica

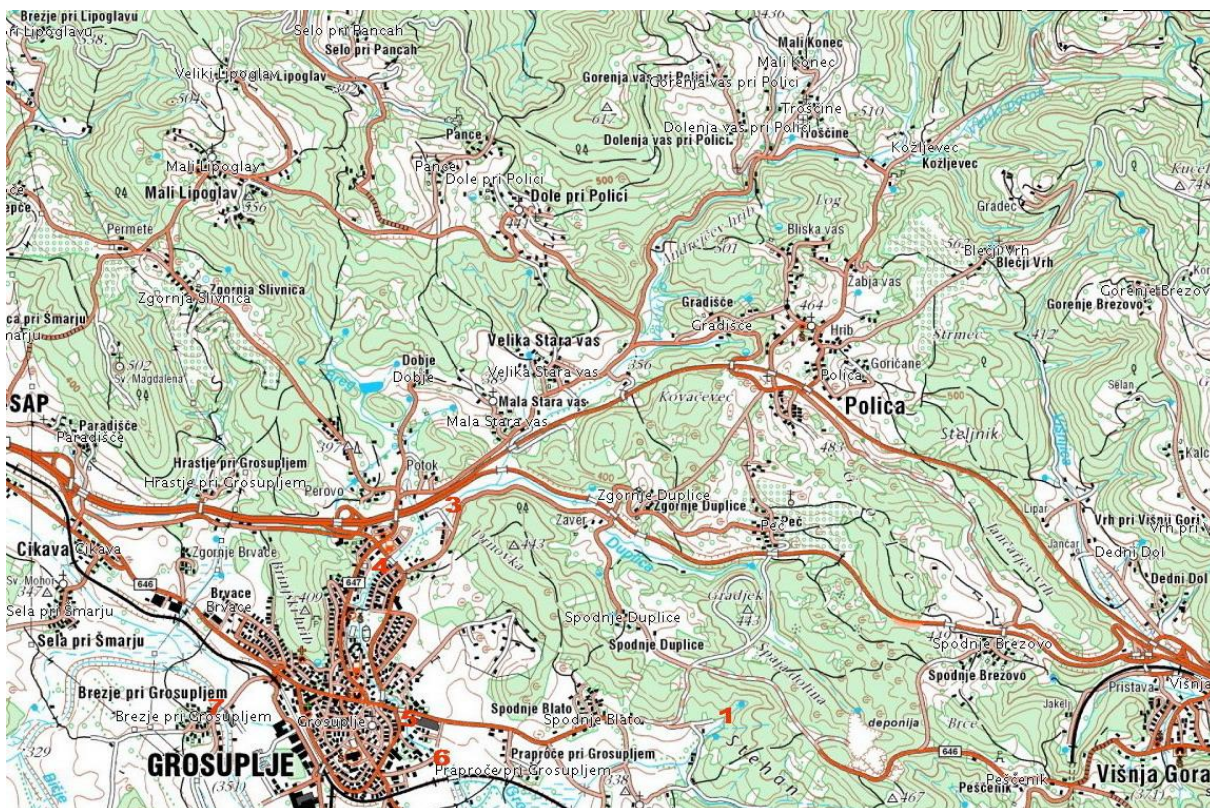
odsek	vodni tok	sediment	breg	zaledje
1	2	4	1, 42	313
2	2	2	42	14, 313
3	2	4	42	313
4	2	4	42	313
5	2	2	42	313, 2
6	2	4	42	313, 2
7	2	4	42	313
8	1	4	42	313, 2
9	1	4	42	313, 2
10	1	4	42	313, 2
11	1	4	42	313, 14
12	2	4	42	24
13	2	4	42	2
14	2	4	42	2
15	2	4	42	2
16	2	4	42	2
17	2	4	42	2
18	3	6	42	2, 12
19	3	6	42	24
20	3	6	6	313
21	3	6	6	313

Priloga G: Rezultati fizikalnih in kemijskih meritev in analiz z dne 14.11.2007 (kemijske  
analize opravljene dne 22.11.2007 v laboratoriju na IFB)

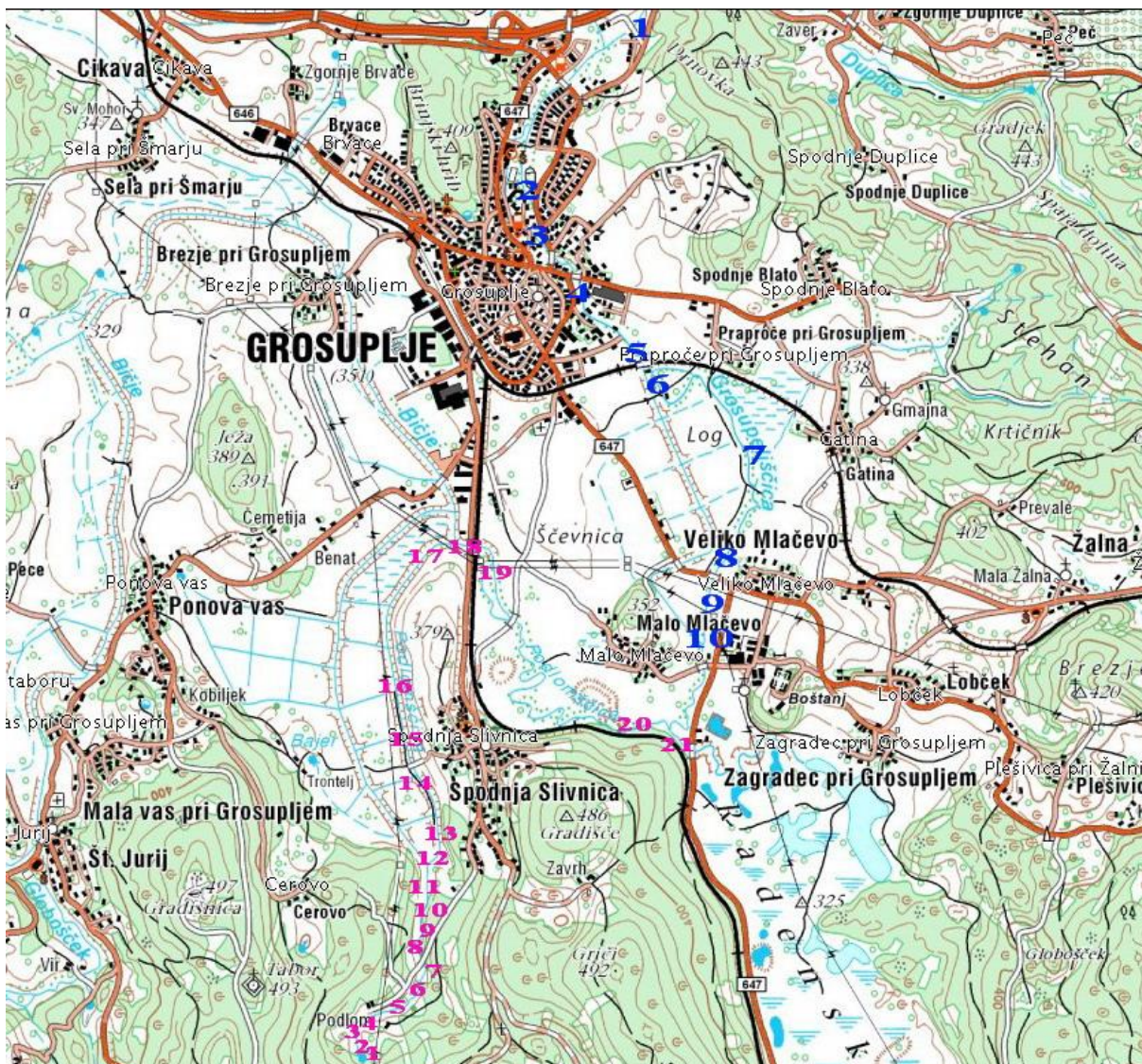
Lokacija	T [°C]	El. prevodnost [μS/cm]	Konc. O <sub>2</sub> [mg/L]	Nasičenost z O <sub>2</sub> [%]	pH	Nitrat [mg/L]	Orto-fosfati [mg/L]
1	8,2	542	9,2	83	8,0	1	0,1
2	8,8	480	8,6	79	7,0	2	0,3
3	7,2	561	9,7	85	7,5	2	0,2
4	7,3	576	9,4	83	8,0	3	0,8
5	6,6	568	9,0	79	7,0	3	pmd.
6	6,4	566	9,3	80	7,5	3	0,6
7	5,3	512	8,2	69	7,5	6	pmd.
8	5,4	504	8,2	68	7,0	5	pmd.
9	7,3	568	7,4	66	7,5	5	0,3
10	7,2	548	7,0	62	8,0	3	0,3
11	7,4	583	6,1	53	8,0	3	0,4

pmd: pod mejo detekcije; meja detekcije: 0,1 mg/L

Priloga H: Zemljevid območja z vrisanimi vzorčnimi mesti za fizikalno-kemijske analize  
in odvzem vzorcev sedimentov (Vir: Geopedia.si)



Priloga I: Zemljevid območja z vrisanimi odseki za popis makrofitov in širšo okoljsko oceno po metodi RCE vodotokov Grosupeljščica in Podlomščica



Odseki Grosupeljščice so označeni z modro barvo. Odseki Podlomščice so označeni z roza barvo.

## Priloga J: Rezultati sekveniranja

### PCR za TGGE

- **pogoji: reakcijska mešanica:**

Mili-q voda: 17,25  $\mu$ L

puffer AB: 2,5  $\mu$ L

MgCl<sub>2</sub>: 1,5  $\mu$ L

BSA(goveji serumski albumin): 0,2  $\mu$ L

U 968gc primer: 1  $\mu$ L

1401 primer: 1  $\mu$ L

dNTP: 0,25  $\mu$ L

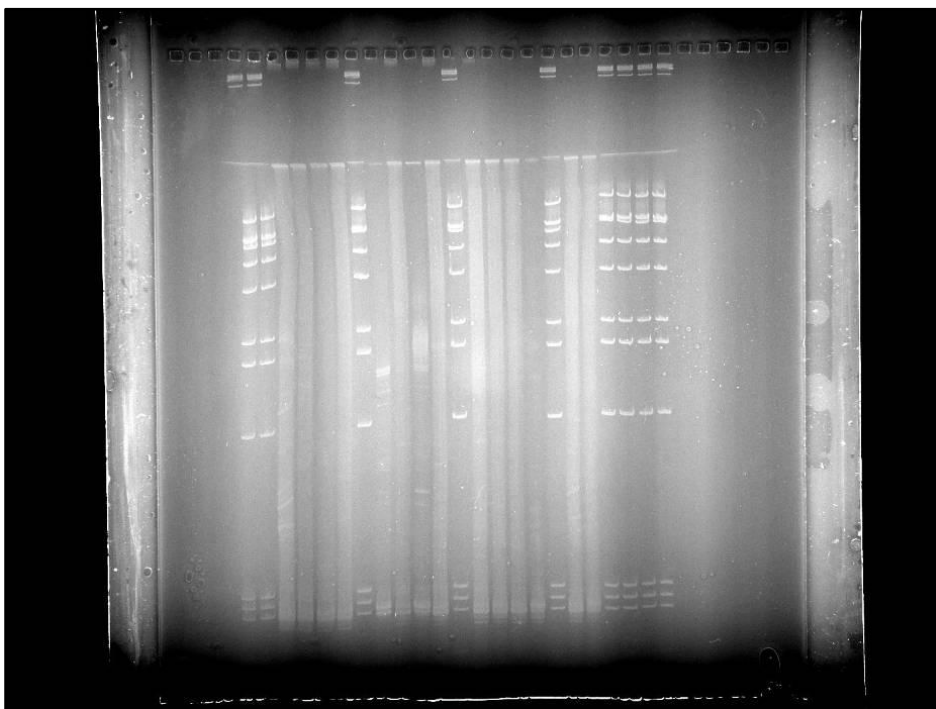
taq-polimeraza: 0,3  $\mu$ L

**temperatura:** 92°C-3 min, (92°C-30 s, 54°C-30 s, 77°C-1 min) 34, 72°C-7 min

- **datumi:** 13.01.2009-11.02.2009

### TGGE

- **pogoji:** 220 V, 16 h, 40-46°C, 30 min barvanja



Slika TGGE gela

### Reamplifikacija

- **pogoji: reakcijska mešanica:**

Mili-q voda: 17,45  $\mu$ L

puffer AB: 2,5  $\mu$ L

MgCl<sub>2</sub>: 1,5 µL

U 968 primer (brez gc repa!): 1 µL

1401 primer: 1 µL

dNTP: 0,25 µL

taq-polimeraza: 0,3 µL

**temperatura:** 92°C-3 min, (92°C-30 s, 54°C-30 s, 77°C-1 min) 34, 72°C-7 min

- **datumi:** 03.03.2009-17.03.2009

## Sekveniranje

- Macrogen Koreja

- datum odpošiljanja vzorcev: 26.3.09

- datum analiz: 10.4.09

## Vzorec A1

### Sekvenca iz FinchTV-ja:

```
GGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACACCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGAG  
ACAATGAGATGCAACTCTGCCAAGATTAGCTAATCTAAAACTCGTTCTAAGTTCGAATTGTAG  
GCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCTGGTCAGCTACACAGCGGTGAA  
TTCGTTCCCGGTCTTGTACACACCGAA
```

219 bp najbolj zanesljivih po FinchTV-ju

### Obdelava v RDP:

a) Seqmatch

no rank Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum Cyanobacteria (20)

class Cyanobacteria (20)

family Chloroplast (20)

genus Bacillariophyta (20)

```
S000641676 not_calculated 0.836 1380 Bacillaria paxillifer; p73; AJ536452  
S000663415 not_calculated 0.807 0542 uncultured bacterium; w3ub13; DQ416489  
S000663996 not_calculated 0.816 0416 uncultured Naviculales; ST9-31D; DQ419332  
S000753871 not_calculated 0.816 1318 uncultured bacterium; ANTLV2_F08; DQ521522  
S000951615 not_calculated 0.807 0870 uncultured bacterium; D15_1_SW_H_48; EU182114  
S001053097 not_calculated 0.807 1357 uncultured bacterium; CM52; EF580940  
S001053122 not_calculated 0.802 1359 uncultured bacterium; CM111; EF580965  
S001101748 not_calculated 0.807 0850 uncultured bacterium; NE-257; EF451954  
S001180257 not_calculated 0.812 1336 uncultured bacterium; SGUS1424; FJ202120  
S001180760 not_calculated 0.812 1336 uncultured bacterium; SGUS937; FJ202623  
S001180965 not_calculated 0.831 1338 uncultured bacterium; SGUS516; FJ202828  
S001186669 not_calculated 0.807 1359 uncultured diatom; 308 T0h-oil; FM242200  
S001186755 not_calculated 0.807 1356 uncultured diatom; 42 T0h-oil; FM242286  
S001186756 not_calculated 0.807 1352 uncultured diatom; 88 T0h-oil; FM242287  
S001186862 not_calculated 0.807 1357 uncultured diatom; 53 T12d-oil; FM242393  
S001186905 not_calculated 0.807 1356 uncultured diatom; 37 T12d+oil; FM242436  
S001224341 not_calculated 0.812 1364 uncultured diatom; MD3.19; FJ425607  
S001224345 not_calculated 0.807 1361 uncultured diatom; MD3.23; FJ425611  
S001268659 not_calculated 0.807 1338 uncultured bacterium; BMM09; EF126235  
S001290788 not_calculated 0.812 1275 uncultured bacterium; KCLunmb_25_16; FJ638592
```

b) Classifier

Bacteria[100%] Cyanobacteria[99%] Cyanobacteria[99%] Chloroplast[99%] Bacillariophyta[90%]

## Obdelava z BLAST-om

>emb|AJ536452.1|BPA536452 Bacillaria paxillifer chloroplast 16S rRNA gene, strain p73  
Length=1479

Score = 374 bits (202), Expect = 1e-100  
Identities = 212/217 (97%), Gaps = 0/217 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1  GGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACACCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAC 60
          |||
Sbjct 1122 GGGATGACGTCAAGTCAGCATGCCCTTACACCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGC 1181

Query 61  GAGACAATGAGATGCAACTCTGCCAAGATTAGCTAATCTAAAACTGTTCTAAGTTCGA 120
          |||
Sbjct 1182 GAGACAATGAGATGCAACTCTGCCAAGATTAGCTAATCTATAAACTGTTCTAAGTTCGG 1241

Query 121 ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCTGGTCAGCTAC 180
          |||
Sbjct 1242 ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCTGGTCAGCTAC 1301

Query 181 ACAGCGGTGAATTCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCG 217
          |||
Sbjct 1302 ACAGCGGTGAATTCGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG 1338
```

## Vzorec A2

### Sekvenca iz FinchTV-ja:

```
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCC
GGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCG
ATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGA
AGTCGGAATCGCTAGTAATC
```

275 bp najbolj zanesljivih po FinchTV-ju

### Obdelava v RDP:

#### a) Seqmatch

no rank Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum Proteobacteria (20)

class Gammaproteobacteria (20)

order Pseudomonadales (20)

family Moraxellaceae (20)

genus Acinetobacter (20)

```
S000001137 not_calculated 1.000 1357 Acinetobacter johnsonii (T); DSM 6963; X81663
S000002617 not_calculated 1.000 1294 Acinetobacter sp.; LY1; AJ007008
S000008827 not_calculated 1.000 1364 Acinetobacter haemolyticus (T); DSM 6962; X81662
S000010335 not_calculated 1.000 1306 Acinetobacter johnsonii; Ben 56; X95303
S000014698 not_calculated 1.000 1438 unidentified bacterium; T17; Z93992
S000014926 not_calculated 1.000 1349 Acinetobacter johnsonii; X89775
S000021304 not_calculated 1.000 1355 Acinetobacter sp.; C6; Y11464
S000093318 not_calculated 1.000 1384 Acinetobacter sp. V4.MO.29; V4.MO.29 = MM_2349; AJ244764
S000095341 not_calculated 1.000 1384 Acinetobacter sp. V4.ME.25; V4.ME.25 = MM_2339; AJ244765
S000102697 not_calculated 1.000 1202 uncultured gamma proteobacterium; Sh765B-TzT-52; AJ519628
S000116345 not_calculated 1.000 1344 Acinetobacter sp. p13F2; AJ495807
S000261742 not_calculated 1.000 1400 uncultured gamma proteobacterium; MTAG9; AJ619070
S000321394 not_calculated 1.000 1382 Acinetobacter johnsonii; P152; AF188300
S000323980 not_calculated 1.000 1284 Acinetobacter beijerinckii; type strain: NIPH 838 = LUH 4759; AJ626712
S000331737 not_calculated 1.000 1328 Acinetobacter sp. NJUST01; AY604193
S000333601 not_calculated 1.000 1339 Acinetobacter sp. YY-5; AY639376
S000341990 not_calculated 1.000 1419 uncultured gamma proteobacterium BioIuz K32; AF324537
S000341991 not_calculated 1.000 1411 uncultured gamma proteobacterium BioIuz K38; AF324538
S000352595 not_calculated 1.000 1289 Acinetobacter sp. phenon 9; LUH 1738 = ACI647; AJ633635
```



S000352596 not\_calculated 1.000 1349 Acinetobacter sp. SH825131.2; SH825131.2 = ACI742; AJ633636

#### b) Classifier

Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Pseudomonadales[100%]  
Moraxellaceae[100%] Acinetobacter[100%]

#### Obdelava z BLAST-om

>gb|FJ821614.1| Acinetobacter sp. TPN104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1307

Score = 508 bits (275), Expect = 4e-141  
Identities = 275/275 (100%), Gaps = 0/275 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTA 60
      |||
Sbjct 980 GAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTA 1039

Query 61 AGCCGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAA 120
      |||
Sbjct 1040 AGCCGGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAA 1099

Query 121 GTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTT 180
      |||
Sbjct 1100 GTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTT 1159

Query 181 GCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGC 240
      |||
Sbjct 1160 GCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGC 1219

Query 241 AACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC 275
      |||
Sbjct 1220 AACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC 1254
```

#### Vzorec A3

##### Sekvenca iz FinchTV-ja:

```
CTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTA
TTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGAACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGG
GGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTAC
AAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGT
CT
```

258 bp najbolj zanesljivih po FinchTV-ju

##### Obdelava v RDP:

###### a) Seqmatch no rank Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum Proteobacteria (20)

class Gammaproteobacteria (20)

order Pseudomonadales (20)

family Moraxellaceae (20)

genus Acinetobacter (20)

S000001137 not\_calculated 1.000 1357 Acinetobacter johnsonii (T); DSM 6963; X81663

S000008827 not\_calculated 1.000 1364 Acinetobacter haemolyticus (T); DSM 6962; X81662

S000010335 not\_calculated 1.000 1306 Acinetobacter johnsonii; Ben 56; X95303

S000014698 not\_calculated 1.000 1438 unidentified bacterium; T17; Z93992

S000014926 not\_calculated 1.000 1349 Acinetobacter johnsonii; X89775

```
S000021304 not_calculated 1.000 1355 Acinetobacter sp.; C6; Y11464
S000093318 not_calculated 1.000 1384 Acinetobacter sp. V4.MO.29; V4.MO.29 = MM_2349; AJ244764
S000095341 not_calculated 1.000 1384 Acinetobacter sp. V4.ME.25; V4.ME.25 = MM_2339; AJ244765
S000102697 not_calculated 1.000 1202 uncultured gamma proteobacterium; Sh765B-TzT-52; AJ519628
S000116345 not_calculated 1.000 1344 Acinetobacter sp. p13F2; AJ495807
S000261742 not_calculated 1.000 1400 uncultured gamma proteobacterium; MTAG9; AJ619070
S000321394 not_calculated 1.000 1382 Acinetobacter johnsonii; P152; AF188300
S000323980 not_calculated 1.000 1284 Acinetobacter beijerinckii; type strain: NIPH 838 = LUH 4759; AJ626712
S000331737 not_calculated 1.000 1328 Acinetobacter sp. NJUST01; AY604193
S000333601 not_calculated 1.000 1339 Acinetobacter sp. YY-5; AY639376
S000341990 not_calculated 1.000 1419 uncultured gamma proteobacterium Bioluz K32; AF324537
S000341991 not_calculated 1.000 1411 uncultured gamma proteobacterium Bioluz K38; AF324538
S000352595 not_calculated 1.000 1289 Acinetobacter sp. phenon 9; LUH 1738 = ACI647; AJ633635
S000352596 not_calculated 1.000 1349 Acinetobacter sp. SH825131.2; SH825131.2 = ACI742; AJ633636
S000358681 not_calculated 1.000 1402 uncultured bacterium; L8; AY444989
```

#### b) Classifier

Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Pseudomonadales[100%]  
Moraxellaceae[100%] Acinetobacter[100%]

#### Obdelava z BLAST-om

Score = 477 bits (258), Expect = 1e-131  
Identities = 258/258 (100%), Gaps = 0/258 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 CTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTT 60
|||||
Sbjct 960 CTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTT 1019

Query 61 CCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAG 120
|||||
Sbjct 1020 CCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAG 1079

Query 121 GAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTAC 180
|||||
Sbjct 1080 GAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTAC 1139

Query 181 AATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCG 240
|||||
Sbjct 1140 AATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCG 1199

Query 241 TAGTCCGATTGGAGTCT 258
|||||
Sbjct 1200 TAGTCCGATTGGAGTCT 1217
```

#### Vzorec A4

##### Sekvenca iz FinchTV-ja:

```
TCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCTTACTTGCCAGCAT
TTCGGATGGGAACCTTTAAGG
```

85 bp najbolj zanesljivih po FinchTV-ju

##### Obdelava v RDP:

###### a) Seqmatch

no rank Root (20) (match sequences)  
domain Bacteria (20)  
phylum Proteobacteria (20)

class Gammaproteobacteria (20)

order Pseudomonadales (20)

family Moraxellaceae (20)

genus Acinetobacter (20)

<a href="#">S000001872</a>	not_calculated 1.000 1374	Acinetobacter baumannii; DSM 30008; X81667
<a href="#">S000008403</a>	not_calculated 1.000 1357	Acinetobacter calcoaceticus; X80285
<a href="#">S000010336</a>	not_calculated 1.000 1371	Acinetobacter junii (T); DSM 6964; X81664
<a href="#">S000011544</a>	not_calculated 1.000 1342	Acinetobacter sp.; Ben 59; X95305
<a href="#">S000012980</a>	not_calculated 1.000 1374	Acinetobacter baumannii (T); DSM 30007; X81660
<a href="#">S000014585</a>	not_calculated 1.000 1371	Acinetobacter junii; DSM 1532; X81658
<a href="#">S000021587</a>	not_calculated 1.000 1439	unidentified bacterium; T27; Z93987
<a href="#">S000128284</a>	not_calculated 1.000 1374	Acinetobacter venetianus; ATCC 31012; AJ295007
<a href="#">S000128704</a>	not_calculated 1.000 1383	Acinetobacter baumannii; KF714; AB109775
<a href="#">S000147422</a>	not_calculated 1.000 1367	Acinetobacter parvus (T); LUH4616 (Aci602); AJ293691
<a href="#">S000147633</a>	not_calculated 1.000 1359	Acinetobacter parvus; LUH3313 (Aci 583); AJ293690
<a href="#">S000277998</a>	not_calculated 1.000 1189	Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus; NW3-43; AY568492
<a href="#">S000278183</a>	not_calculated 1.000 1195	uncultured Acinetobacter sp.; NW3-33; AY568488
<a href="#">S000331724</a>	not_calculated 1.000 1403	uncultured bacterium; DR9IPCB16SCT1; AY604050
<a href="#">S000332200</a>	not_calculated 1.000 1323	Acinetobacter sp. EDP3; AY613433
<a href="#">S000333178</a>	not_calculated 1.000 1401	Acinetobacter seohaensis; SW-100; AY633608
<a href="#">S000352594</a>	not_calculated 1.000 1293	Acinetobacter sp. phenon 8; LUH 4713 = ACI607; AJ633634
<a href="#">S000352599</a>	not_calculated 1.000 1276	Acinetobacter sp. LMG M71; LMG M71 = ACI788; AJ633639
<a href="#">S000364651</a>	not_calculated 1.000 1403	Acinetobacter sp. PAMU-1.11; AB118222
<a href="#">S000366194</a>	not_calculated 1.000 1362	Acinetobacter junii; AF417863

b) Classifier

Bacteria[100%] Proteobacteria[98%] Gammaproteobacteria[95%] Pseudomonadales[93%]

Moraxellaceae[92%] Acinetobacter[91%]

### Obdelava z BLAST-om

Acinetobacter sp. TPN102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1360

Score = 158 bits (85), Expect = 4e-36  
Identities = 85/85 (100%), Gaps = 0/85 (0%)  
Strand=Plus/Plus

```
Query 1 TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTACTTGCC 60
|||||
Sbjct 1026 TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTACTTGCC 1085
```

```
Query 61 AGCATTTCGGATGGGAACCTTAAGG 85
|||||
Sbjct 1086 AGCATTTCGGATGGGAACCTTAAGG 1110
```

### Vzorec A6

#### Sekvenca iz FinchTV-ja:

```
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTAAGCC
GGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCA
TGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCC
ATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
252 bp najbolj zanesljivih po FinchTV-ju
```

#### Obdelava v RDP:

a) Seqmatch

**Lineage:**

**Results for Query Sequence: unknown, 244 unique oligos**

**no rank** Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum Proteobacteria (20)

class Gammaproteobacteria (20)

order Pseudomonadales (20)

family Moraxellaceae (20)

genus Acinetobacter (20)

[S000001137](#) not\_calculated 1.000 1357 Acinetobacter johnsonii (T); DSM 6963; X81663  
[S000002617](#) not\_calculated 1.000 1294 Acinetobacter sp.; LY1; AJ007008  
[S000008827](#) not\_calculated 1.000 1364 Acinetobacter haemolyticus (T); DSM 6962; X81662  
[S000010335](#) not\_calculated 1.000 1306 Acinetobacter johnsonii; Ben 56; X95303  
[S000014698](#) not\_calculated 1.000 1438 unidentified bacterium; T17; Z93992  
[S000014926](#) not\_calculated 1.000 1349 Acinetobacter johnsonii; X89775  
[S000021304](#) not\_calculated 1.000 1355 Acinetobacter sp.; C6; Y11464  
[S000093318](#) not\_calculated 1.000 1384 Acinetobacter sp. V4.MO.29; V4.MO.29 = MM\_2349; AJ244764  
[S000095341](#) not\_calculated 1.000 1384 Acinetobacter sp. V4.ME.25; V4.ME.25 = MM\_2339; AJ244765  
[S000102697](#) not\_calculated 1.000 1202 uncultured gamma proteobacterium; Sh765B-TzT-52; AJ519628  
[S000116345](#) not\_calculated 1.000 1344 Acinetobacter sp. p13F2; AJ495807  
[S000261742](#) not\_calculated 1.000 1400 uncultured gamma proteobacterium; MTAG9; AJ619070  
[S000321394](#) not\_calculated 1.000 1382 Acinetobacter johnsonii; P152; AF188300  
[S000323980](#) not\_calculated 1.000 1284 Acinetobacter beijerinckii; type strain: NIPH 838 = LUH 4759; AJ626712  
[S000331737](#) not\_calculated 1.000 1328 Acinetobacter sp. NJUST01; AY604193  
[S000333601](#) not\_calculated 1.000 1339 Acinetobacter sp. YY-5; AY639376  
[S000341990](#) not\_calculated 1.000 1419 uncultured gamma proteobacterium BioIuz K32; AF324537  
[S000341991](#) not\_calculated 1.000 1411 uncultured gamma proteobacterium BioIuz K38; AF324538  
[S000352595](#) not\_calculated 1.000 1289 Acinetobacter sp. phenon 9; LUH 1738 = ACI647; AJ633635  
[S000352596](#) not\_calculated 1.000 1349 Acinetobacter sp. SH825131.2; SH825131.2 = ACI742; AJ633636

b) Classifier

Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Pseudomonadales[100%]

Moraxellaceae[100%] Acinetobacter[100%]

**Obdelava z BLAST-om**

Uncultured prokaryote isolate DGGE gel band Cheese\_Farm4\_u3 16S  
ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=425

Score = 466 bits (252), Expect = 2e-128  
Identities = 252/252 (100%), Gaps = 0/252 (0%)  
Strand=Plus/Plus

Query 1 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTA 60  
|||||  
Sbjct 106 GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTTA 165

Query 61 AGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAA 120  
|||||  
Sbjct 166 AGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAA 225

Query 121 GTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTT 180  
|||||  
Sbjct 226 GTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTT 285

Query 181 GCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGC 240  
|||||  
Sbjct 286 GCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGC 345

Query 241 AACTCGACTCCA 252  
|||||  
Sbjct 346 AACTCGACTCCA 357

## Vzorec A7

### Sekvenca iz FinchTV-ja:

TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCG  
GTCCGGCCGGGAAC TCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  
AGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGC  
GACCTCGGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTC  
GAC

256 bp najbolj zanesljivih po FinchTV-ju

### Obdelava v RDP:

a) Seqmatch

#### Lineage:

Results for Query Sequence: unknown, 250 unique oligos

no rank Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum Proteobacteria (20)

class Gammaproteobacteria (20)

order Enterobacteriales (20)

family Enterobacteriaceae (20)

genus Escherichia (12)

[S000004313](#) not\_calculated 1.000 1352 Escherichia coli (T); ATCC 11775T; X80725

[S000511335](#) not\_calculated 1.000 1201 uncultured gamma proteobacterium; NEC03035; AY911444

[S000653072](#) not\_calculated 1.000 1459 Escherichia coli UTI89; CP000243

[S000653076](#) not\_calculated 1.000 1459 Escherichia coli UTI89; CP000243

[S000711522](#) not\_calculated 1.000 1454 Escherichia coli 536; CP000247

[S000711527](#) not\_calculated 1.000 1454 Escherichia coli 536; CP000247

[S000711530](#) not\_calculated 1.000 1454 Escherichia coli 536; CP000247

[S000768443](#) not\_calculated 1.000 1299 gamma proteobacterium Sflu5; AJ699169

[S000857270](#) not\_calculated 1.000 1417 uncultured bacterium; 16saw44-1a05.p1k; EF604190

[S000860490](#) not\_calculated 1.000 1338 Escherichia coli; BEE15; EF560791

[S000860495](#) not\_calculated 1.000 1308 Escherichia coli; BETD; EF560796

[S000873818](#) not\_calculated 1.000 1245 uncultured gamma proteobacterium; AnCha112f; EF076230

genus Enterobacter (1)

[S000021184](#) not\_calculated 1.000 1408 Enterobacter cloacae subsp. cloacae (T); ATCC13047T; AJ251469

genus Shigella (5)

[S000000258](#) not\_calculated 1.000 1397 Shigella dysenteriae (T); X96966

[S000009863](#) not\_calculated 1.000 1427 uncultured bacterium; AJ487021

[S000013935](#) not\_calculated 1.000 1405 Shigella flexneri (T); X96963

[S000014100](#) not\_calculated 1.000 1417 uncultured bacterium; AJ487022

[S000344063](#) not\_calculated 1.000 1376 uncultured bacterium; p-229-o5; AF371848

unclassified\_Enterobacteriaceae (2)

[S000133399](#) not\_calculated 1.000 1418 Escherichia albertii (T); type strain: LMG 20976; AJ508775

[S000139289](#) not\_calculated 1.000 1384 Escherichia fergusonii (T); ATCC 35469; AF530475

b) Classifier

Bacteria[100%] Proteobacteria[100%] Gammaproteobacteria[100%] Enterobacteriales[100%]

Enterobacteriaceae[100%] Escherichia[60%]

### Obdelava z BLAST-om

Escherichia coli strain TCP-1 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete  
sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1416

Score = 473 bits (256), Expect = 1e-130

Identities = 256/256 (100%), Gaps = 0/256 (0%)  
Strand=Plus/Plus

Query 1 TCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCC 60  
|||||  
Sbjct 81 TCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCC 140

Query 61 AGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGAT 120  
|||||  
Sbjct 141 AGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGAT 200

Query 121 GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAC 180  
|||||  
Sbjct 201 GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAC 260

Query 181 AAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTG 240  
|||||  
Sbjct 261 AAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTG 320

Query 241 GAGTCTGCAACTCGAC 256  
|||||  
Sbjct 321 GAGTCTGCAACTCGAC 336

## Vzorec A8

### Sekvenca iz FinchTV-ja:

TGGCAGTGATAAAATGGAAAAGGGGGGGATGACGTCAATTCTCATGGCCCTTATGGGCGGG  
GCTACCCCCCTTCTACAATGGCTCGTACAAAGGGTTGCCACCCCGGGGAGCTAACCAATCCCA  
TAAAGTC

134 bp najbolj zanesljivih po FinchTV-ju

### Obdelava v RDP:

a) Seqmatch

#### Lineage:

**Results for Query Sequence: unknown, 128 unique oligos**

**no rank** Root (20) (match sequences)

domain Bacteria (20)

phylum Proteobacteria (20)

class Alphaproteobacteria (1)

order Rhodobacterales (1)

family Rhodobacteraceae (1)

unclassified\_Rhodobacteraceae (1)

S000455599 not\_calculated 0.469 2671 uncultured alpha proteobacterium; F3C99; AY794179

class Betaproteobacteria (19)

order Burkholderiales (19)

family Comamonadaceae (19)

genus Delftia (1)

S001177838 not\_calculated 0.461 1354 uncultured Diaphorobacter sp.; GI3-S-2-F02; FJ192152

genus Hydrogenophaga (15)

S000634938 not\_calculated 0.453 1449 uncultured Comamonadaceae bacterium; DS004; DQ234089

S000634952 not\_calculated 0.453 1448 uncultured Comamonadaceae bacterium; DS019; DQ234103

S000635034 not\_calculated 0.453 1450 uncultured Comamonadaceae bacterium; DS102; DQ234185

S000635044 not\_calculated 0.453 1449 uncultured Comamonadaceae bacterium; DS112; DQ234195

S000635048 not\_calculated 0.453 1449 uncultured Comamonadaceae bacterium; DS116; DQ234199

S000635083 not\_calculated 0.453 1473 uncultured Comamonadaceae bacterium; DS152; DQ234234

S001133048 not\_calculated 0.453 1412 uncultured bacterium; IC226566; EU799014

S001133122 not\_calculated 0.453 1417 uncultured bacterium; IC226647; EU799088

S001133151 not\_calculated 0.453 1413 uncultured bacterium; IC226679; EU799117

S001133190 not\_calculated 0.453 1413 uncultured bacterium; 1C226724; EU799156  
S001133203 not\_calculated 0.453 1413 uncultured bacterium; 1C226738; EU799169  
S001133210 not\_calculated 0.453 1415 uncultured bacterium; 1C226746; EU799176  
S001133231 not\_calculated 0.453 1417 uncultured bacterium; 1C226768; EU799197  
S001135076 not\_calculated 0.469 1416 uncultured bacterium; 2C229340; EU801042  
S001136277 not\_calculated 0.461 1417 uncultured bacterium; 3C003682; EU802243  
genus Rhodoferrax (2)  
S000701951 not\_calculated 0.461 1444 beta proteobacterium LH90; DQ535028  
S001135514 not\_calculated 0.461 1413 uncultured bacterium; 3C002783; EU801480  
unclassified\_Comamonadaceae (1)  
S001136276 not\_calculated 0.461 1418 uncultured bacterium; 3C003680; EU802242

#### b) Classifier

Bacteria[83%] Proteobacteria[41%] Betaproteobacteria[27%] Burkholderiales[22%] Comamonadaceae[17%]  
Xenophilus[0%]

#### Obdelava z BLAST-om

Uncultured Candidatus Liberibacter sp. clone GS263 16S ribosomal  
RNA gene, partial sequence  
Length=779

Score = 100 bits (54), Expect = 1e-18  
Identities = 83/97 (85%), Gaps = 2/97 (2%)  
Strand=Plus/Plus

Query 6 GTGATAAAATGGAAAAA ggggggggATGACGTCAATTCCTCATGGCCCTTATGGGCGGGGC 65  
||||| ||| ||| ||||||||| |||||||||||||  
Sbjct 433 GTGATAAGCCGGAAGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGCGGGGC 492

Query 66 TACCCCCCTTCTACAATGGCTCGT-ACAAAGGGTTGC 101  
||| | ||||||| | ||| |||||  
Sbjct 493 TACACACGTGCTACAATGG-TGGTTACAATGGGTTGC 528