

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Ana FORTIČ

**TROFIČNA EKOLOGIJA UHATEGA
KLOBUČNJAKA (*Aurelia aurita* s.l.) IN VPLIV NA
MIKROBNO ZANKO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Ana FORTIČ

TROFIČNA EKOLOGIJA UHATEGA KLOBUČNJAKA (*Aurelia aurita* s.l.) IN VPLIV NA MIKROBNO ZANKO

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**TROPHIC ECOLOGY OF THE MOON JELLY (*Aurelia aurita* s.l.)
AND ITS INFLUENCE ON THE MICROBIAL LOOP**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je nastalo v okviru magistrskega študija Strukturna in funkcionalna biologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je potekal na Morski biološki postaji Nacionalnega inštituta za biologijo ter v laboratorijih Katedre za zoologijo in Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

Študijska komisija magistrskega programa Strukturna in funkcionalna biologija je dne 19. 6. 2014 odobrila naslov magistrskega dela. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Jasna Štrus, za somentorico prof. dr. Valentina Turk in za recenzenta izr. prof. dr. Rudi Verovnik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Polona ZALAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Valentina TURK
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja

Članica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Rudi VEROVNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 23. 9. 2016

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Ana FORTIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Du2
DK	UDK 593.73(043.2)
KG	uhati klobučnjaki/mikrobna zanka/sluz/prehranjevanje/bakterije
AV	FORTIČ, Ana, dipl. biol. (UN)
SA	ŠTRUS, Jasna (mentorica)/TURK, Valentina (somentorica)/VEROVNIK, Rudi (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
LI	2016
IN	TROFIČNA EKOLOGIJA UHATEGA KLOBUČNJAKA (<i>Aurelia aurita</i> s.l.) IN VPLIV NA MIKROBNO ZANKO
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XII, 67 str., 8 pregl., 18 sl., 4 pril., 103 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Uhati klobučnjak (<i>Aurelia aurita</i>) je ena pogostejših in najbolj preučevanih meduz v severnem Jadranu, kjer pogosto prihaja do masovnih pojavov meduz. Ti močno vplivajo na obalni turizem, ribogojnice in tudi strukturo prehranskih verig. Uhati klobučnjak lahko postane namesto rib glavni plenilec v ekosistemu, ker ima malo naravnih plenilcev, s svojimi izločki pa vpliva na biogeokemijske procese in ekološko stanje morja. Vpliva tudi na rast in vrstno sestavo bakterijskih združb, kar je predmet le redkih raziskav. O povezavi bakterij s polipno fazo razvoja je znanega še manj. Z različnimi metodami priprave histoloških vzorcev in štirimi tehnikami barvanja smo preučili zgradbo polipov uhatega klobučnjaka. Te vsebujejo veliko sluzi, prisotni mucini so tako kisle kot tudi nevtralne narave. Za lokalizacijo bakterij v sluzi smo preizkusili tehniki elektronske mikroskopije, SEM in TEM. Na površini polipov in v sluzi nismo našli večjega števila bakterij, kar je lahko tudi posledica postopkov pri pripravi preparatov. Z mikroskopskimi metodami smo na pedalnem disku polipa odkrili mikroorganizme, ki vsebujejo klorofil, najverjetneje alge, ki uspevajo na substratih kamor se pritrdijo polipi. Število heterotrofnih bakterij v morski vodi se ob prisotnosti polipov poveča, kar povezujemo z izločanjem sluzi in drugih snovi, ki jih bakterije potrebujejo za rast. V poskusih z bakterijami označenimi s tritijem smo ugotovili, da efire, polipi in ceponožci lahko v določenih razmerah privzemajo bakterije. Predvidevamo, da jih lahko uporabijo kot hrano, vendar tega s poskusi nismo potrdili. Naši rezultati kažejo, da polipi in efire uhatega klobučnjaka vplivajo na delovanje in strukturo mikrobne zanke.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Du2
DC	UDC 593.73(043.2)
CX	Moon jelly/microbial loop/mucus/feeding/bacteria
AU	FORTIČ, Ana
AA	ŠTRUS, Jasna (supervisor)/TURK, Valentina (co-supervisor)/VEROVNIK, Rudi (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes in Structural and Functional Biology
PY	2016
TI	TROPHIC ECOLOGY OF THE MOON JELLY (<i>Aurelia aurita</i> s.l.) AND ITS INFLUENCE ON THE MICROBIAL LOOP
DT	M.Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	XII, 67 p., 8 tab., 18 fig., 4 ann., 103 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Moon jelly (<i>Aurelia aurita</i>) is a common and well-studied species of jellyfish in the Northern Adriatic, where jellyfish blooms are very frequent. Jellyfish blooms often affect coastal tourism, fisheries and also the structure of food chains in the sea. Moon jelly, with its few natural predators, can become the top predator, replacing fish in the ecosystem. With its excrement it is involved in biogeochemical cycling and has a significant impact on the ecological state of the sea. Only few experiments, of which even fewer included the polyp stage of the development, show that moon jelly also affects growth and composition of bacterial communities. We discerned morphology and anatomy of the polyps, using different histological methods of preparation and staining. Mucus present in moon jelly polyps is abundant and contains acidic and neutral mucins. In order to localize bacteria in the mucus, we used scanning and transmission electron microscopy techniques. These methods did not reveal considerable amount of bacteria on the inner, outer surface and mucus of the polyp, which may also be due to the preparation techniques. Microorganisms containing chlorophyll on the pedal disc of the polyps, presumably algae, were detected by microscopy. In sea water, we observed an increase in heterotrophic bacteria count in the presence of the moon jelly polyps, presumably because of the excretion of the mucus and other substances which can be utilized by the bacteria. Experiments with ³ H labelled bacteria showed that polyps, ephyrae and copepods are able to consume bacteria, in certain conditions. We assume that bacteria could be used as food, but were unable to prove it experimentally. Considering our results, we conclude that polyps and ephyrae of the moon jelly actively affect the microbial loop.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 OPIS VRSTE UHATI KLOBUČNJAK <i>Aurelia aurita</i> s.l.	3
2.1.1 Uvrstitev uhatega klobučnjaka v sistem	3
2.1.2 Razvojni krog in ekologija življenjskih faz uhatega klobučnjaka	4
2.2 MORFOLOGIJA/HISTOLOGIJA RAZLIČNIH ŽIVLJENJSKIH FAZ UHATEGA KLOBUČNJAKA S POUDARKOM NA GASTROVASKULARNEM SISTEMU	6
2.2.1 Morfologija polipa ter efire	6
2.2.2 Morfologija in histologija meduze	7
2.3 PREHRANJEVANJE IN PREBAVA UHATEGA KLOBUČNJAKA	7
2.3.1 Prehrana polipov, efir in meduz	7
2.3.2 Plenenje in prebava polipov, efir in meduz	8
2.4 MNOŽIČNO POJAVJANJE ŽELATINOZNEGA PLANKTONA V TRŽAŠKEM ZALIVU	9
2.4.1 Opis Tržaškega zaliva	9
2.4.2 Masovni pojavi želatinoznega planktona	9
2.4.3 Vloga polipov pri vzdrževanju meduznih populacij	10
2.5 MIKROBI IN ZOOPLANKTON	11
2.5.1 Tipi odnosov med zooplanktonom in bakterijami	11
2.5.2 Mikrobi v prebavilu nevretenčarjev	12

2.5.3	Katere bakterije so vpletene v odnosez morskimi nevretenčarji.....	12
2.5.4	Mikrobiota uhatega klobučnjaka	13
2.6	VPLIV KLOBUČNJAKOV NA MIKROBNO ZANKO	14
2.6.1	Trofične interakcije med uhatim klobučnjakom in mikrobno zanko.....	14
2.7	VLOGA SLUZI OŽIGALKARJEV	15
3	MATERIAL IN METODE	16
3.1	VZORČENJE POLIPOV NA TERENU	16
3.2	VZDRŽEVANJE IN HRANJENJE POLIPOV	16
3.2.1	Indukcija strobilacije polipov	17
3.3	HISTOLOŠKA ANALIZA POLIPOV UHATEGA KLOBUČNJAKA (<i>Aurelia aurita</i> s. l.).....	17
3.3.1	Priprava histoloških vzorcev polipov	18
3.3.1.1	Narkotizacija polipov	18
3.3.1.2	Fiksacija, vklapljanje in rezanje polipov.....	18
3.3.1.2.1	Prva tehnika fiksacije polipov (fiksacija 1).....	18
3.3.1.2.2	Druga tehnika fiksacije (fiksacija 2)	19
3.3.1.2.3	Tretja tehnika fiksacije (fiksacija 3).....	19
3.3.1.2.4	Materiali uporabljeni pri treh tehnikah fiksacije polipov	20
3.3.2	Barvanje parafinskih in kriostatskih rezin.....	20
3.3.2.1.	Klasično histološko barvanje s hematoksilinom in eozinom (HE).....	20
3.3.2.2	Barvanje sluzi z barvilom Alcian modrim	21
3.3.2.3	Barvanje mukopolisaharidov s postopkom PAS.....	21
3.3.2.4	Barvanje z DAPI	21
3.3.2.5	Materiali uporabljeni pri barvanju	21
3.3.3	Mikroskopiranje in analiza histoloških rezin	22
3.4	VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)	23
3.4.1	Priprava vzorcev	23
3.4.2	Opazovanje preparatov s SEM.....	24
3.5	PRESEVNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)	24
3.5.1	Priprava vzorcev z negativnim kontrastiranjem	24
3.5.2	Opazovanje preparatov s TEM	25
3.6	VPLIV POLIPOV NA NARAVNO POPULACIJO BAKTERIJ	25

3.7	POSKUSI Z RADIOAKTIVNO OZNAČENIMI BAKTERIJAMI.....	25
3.7.1	Izvedba prvega (preliminarnega) poskusa z radioaktivnim označevanjem	26
3.7.1.1	Priprava bakterijske kulture označene s ^3H	26
3.7.1.2	Potek poskusa.....	26
3.7.2	Izvedba drugega poskusa z radioaktivnim označevanjem.....	27
3.7.2.1	Priprava kulture naravne populacije bakterij iz morske vode označene s ^3H	27
3.7.2.2	Priprava polipov, efir in ceponožcev	27
3.7.2.3	Potek poskusa.....	28
3.7.3	Materiali uporabljeni v prvem in drugem poskusu.....	29
3.7.4	Določanje števila bakterij z mikroskopiranjem.....	30
3.7.4.1	Priprava vzorcev za štetje bakterij	30
3.7.4.2	Mikroskopija in štetje bakterij	31
4	REZULTATI.....	32
4.1	INDUKCIJA STROBILACIJE POLIPOV.....	32
4.2	HISTOLOŠKA ZGRADBA POLIPOV UHATEGA KLOBUČNJAKA (<i>Aurelia aurita</i> s. l.).....	32
4.2.1	Histološka zgradba polipov po barvanju s hematoksilinom in eozinom (HE)	33
4.2.2	Histološka zgradba polipov po barvanju z Alcian modrim (AB).....	36
4.2.3	Histološka zgradba polipov po barvanju s postopkom PAS.....	38
4.2.4	Zgradba celih polipov po barvanju z DAPI	39
4.3	STRUKTURA POVRŠINE POLIPOV POSNETA Z VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO (SEM)	40
4.4	SLUZ POLIPA POSNETA S PRESEVNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO (TEM)	42
4.5	VPLIV POLIPOV IN EFIR NA PREHRANSKE SPLETE IN BAKTERIJSKO POPULACIJO.....	43
4.5.1	Vpliv polipov na naravno populacijo bakterij	43
4.5.2	Poskusi z radioaktivno označenimi bakterijami	44
4.5.2.1	Prvi poskus.....	44
4.5.2.2	Drugi poskus	45
5	RAZPRAVA	48

5.1	MIKROSKOPSKE RAZISKAVE UHATEGA KLOBUČNJAKA	48
5.1.1	Histološka zgradba polipov	48
5.1.2	Vloga biofilma pedalnega diska	49
5.1.3	Podrobna zgradba polipov uhatega klobučnjaka (SEM, TEM).....	49
5.2	VPLIV POLIPOV IN EFIR NA PREHRANSKE SPLETE IN BAKTERIJSKO POPULACIJO.....	50
6	SKLEPI	56
7	POVZETEK	57
8	VIRI.....	59
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Sl. 1: Življenjski cikel uhatega klobučnjaka (prirejeno po Bornhofft, 2016).....	6
Sl. 2: Vzorčenje polipov na terenu.	16
Sl. 3: Gojenje polipov in ličink solinskega rakca	17
Sl. 4: Shema metode drugega poskusa z radioaktivno označenimi bakterijami.....	29
Sl. 5: Različni razvojni stadiji uhatega klobučnjaka.....	32
Sl. 6: Spremljanje strobilacije polipov (Foto: T. Makovec).....	32
Sl. 7: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko zamrzovanja (fiksaciji 1 in 2) in barvani s hematoksilinom in eozinom (HE).....	34
Sl. 8: Histološki preparati polipov, pripravljenih s tehniko parafinskih rezin (fiksacija 3) in barvani s hematoksilinom in eozinom (HE).....	35
Sl. 9: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko parafinskih rezin (fiksacija 3) in barvani s Alcian modrim in nuclear fast red.....	36
Sl. 10: Histološki preparati polipov, s tehniko zamrzovanja (fiksaciji 1 in 2) in barvani s Alcian modrim in Gillovim hematoksilinom ali nuclear fast red.....	37
Sl. 11: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko parafinskih rezin (fiksacija 3) in barvani po postopku PAS in DAPI.....	38
Sl. 12: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko zamrzovanja (fiksaciji 1 in 2) in barvani po postopku PAS in DAPI.....	39
Sl. 13: Preparati celih polipov barvanih z DAPI	40
Sl. 14: Površina polipov pod vrstičnim elektronskim mikroskopom	41
Sl. 15: Macerat polipa, negativni kontrast (TEM).....	42
Sl. 16: Paličaste strukture iz vzorca brisa gastralne votline, negativni kontrast (TEM).....	42
Sl. 17: Število bakterij v filtrirani morski vodi z in brez polipov po 24 urah inkubacije....	43
Sl. 18: Shematski prikaz trofičnih interakcij med elementi prehranske verige.....	55

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Taksonomska uvrstitev uhatega klobučnjaka (ITIS, 2016).....	3
Pregl. 2: Tehnike barvanja, ki smo jih uporabili pri delu.	33
Pregl. 3: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) v prvem poskusu.	45
Pregl. 4: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) pri polipih v drugem poskusu	45
Pregl. 5: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) pri efirah.....	45
Pregl. 6: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) pri ceponožcih.....	46
Pregl. 7: Število bakterij pred in po inkubaciji v drugem poskusu z radioaktivno označenimi bakterijami.....	47
Pregl. 8: Seznam vrst plena polipov in efir uhatega klobučnjaka.....	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

^3H	tritij-radioaktivni izotop vodika
AB	barvilo Alcian modro (ang. Alcian blue)
bE	Obravnava z efirami, ki smo jim dodali bakterije označene s tritijem
bE_K	kontrola – obravnava z efirami, ki smo jim dodali bakterije označene s tritijem
bC15	obrnava s 15 ceponožci, ki smo jim dodali bakterije označene s tritijem
bC9	obrnava s 9 ceponožci, ki smo jim dodali bakterije označene s tritijem
BF	Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani
BF5	vzorčevalna točka oceanografske boje Vida, na globini 5 m
bP	obrnava s polipi, ki smo jim dodali bakterije označene s tritijem
bP_K	kontrola - obravnava z mrtvi polipi, ki smo jim dodali bakterije označene s tritijem
DMSO	dimetilsulfoksid
DAPI	fluorescentno barvilo 4',6-diamidino-2-fenilindol
DOM	raztopljena organska snov (ang. dissolved organic matter)
dpm	število razpadov na minuto (ang. disintegration per minute)
F ₁	radioaktivno označena kultura, filtrirana na 1 μm
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (ang. fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
HE	hematoksilin- eozin
HMDS	heksametildisilazan
K ₁	radioaktivno označena kultura, redčena na enako koncentracijo kot je bila po koncu inkubacije
MBP/NIB	Morska biološka postaja/ Nacionalni inštitut za biologijo
MV	morska voda
NCBI	državni center za biotehnoške informacije (ang. national center for biotechnology information)
nj.	njihove
POM	delci organske snovi (ang. particulate organic matter)
PAS	barvanje s perjudno kislino in Schiffovim reagentom (ang. periodic acid–Schiff)
SEM	vrstična elektronska mikroskopija (ang. scanning electron microscopy)

Sp	Praktična slanost, ki temelji na merjenju električne prevodnosti morske vode
t_0	začetek inkubacije
t_{24}	po 24 urah inkubacije
t_{end}	konec inkubacije
TEM	presevna elektronska mikroskopija (ang. transmission electron microscopy)
WoRMS	svetovni register morskih vrst (ang. World register of marine species)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Sredozemsko morje je dom večih vrst meduz, nekatere ljudje preučujejo že stoletja, spet druge so bolj redke in slabše preučene. V severnem Jadranu so pogosta masovna pojavljanja velikih meduz, ki močno vplivajo na obalni turizem, ribogojnice in tudi strukturo prehranskih verig. Vzroki za njihovo množično pojavljanje in spremembe v velikosti populacij nekaterih meduz niso povsem znani, vendar raziskave kažejo, da so pri tem pomembni tudi antropogeni vplivi na morsko okolje. Podnebne spremembe, prelov, onesnaževanje in z njim povezani procesi evtrofikacije, ladijski prevoz ter gradnja podvodnih obalnih struktur, kamor se pritrjajo polipne generacije, so le nekateri izmed možnih vzrokov (Brotz in Pauly, 2012; Duarte in sod., 2012).

Ena pogostejših in najbolj preučevanih meduz tega območja je uhati klobučnjak (*Aurelia aurita*) (Malej in sod., 2012). Ta ožigalkar spada v razred klobučnjakov (Scyphozoa) in je tudi najbolj razširjena vrsta klobučnjakov v obalnih vodah po svetu (Kramp, 1961). Klobučnjaki imajo zapleten življenjski cikel, ki vključuje planktonsko meduzo, sposobno spolnega razmnoževanja in bentoški polip, ki predstavlja nespolno generacijo (Holst in Jarms, 2007).

Polipi igrajo pomembno vlogo pri vzdrževanju meduznih populacij, njihove ekološke in morfološke prilagoditve pa jim zagotavljajo preživetje v neugodnih razmerah. Klobučnjaški polipi so zelo dolgoživi, tolerirajo velike spremembe abiotičnih dejavnikov, imajo hiter razvoj, veliko načinov nespolnega razmnoževanja ter še mnogo drugih lastnosti, ki omogočajo široko razširjenost. Odličen habitat jim predstavljajo senčne površine in umetni materiali, kot so pomoli, doki, marine in podobne konstrukcije. Taka mesta lahko najdemo tudi v Jadranu ter tudi v slovenskem obalnem morju, v Luki Koper (Lucas in sod., 2012; Brotz in Pauly, 2012; Duarte in sod., 2012).

Uhati klobučnjak je oportunistični plenilec in se hrani pretežno z zooplanktonom kot so raki ceponožci, nevretenčarske ličinke, ribja jajčeca in ličinke ter repati plaščarji (Shick, 1975, Arai, 1997; Ishii in Tanaka, 2001). Novejše raziskave pa kažejo, da del prehrane lahko predstavlja tudi raztopljena organska snov (DOM – ang. dissolved organic matter) (Skikne in sod., 2009).

Množično pojavljanje meduz uhatega klobučnjaka v plitkih obalnih habitatih pomembno vpliva na številčnost populacije zooplanktona. Uhati klobučnjak v takih okoljih kontrolira strukturo prehranjevalnih spletov in lahko, ker ima malo naravnih plenilcev, postane namesto rib glavni plenilec v ekosistemu. S svojimi produkti vpliva tudi na biogeokemijske procese in ekološko stanje morja. Le redke študije nakazujejo, da klobučnjaki vplivajo tudi na rast in vrstno sestavo bakterioplanktona (Olesen, 1995; Malej in sod., 2006; Graham in sod., 2009; Tinta in sod., 2012; D'Ambra in sod., 2013).

Mikroorganizmi, ki pritrjeni živijo na živalih igrajo pomembno vlogo v njihovem življenju, nekateri znanstveniki celo predlagajo, da bi popis pritrjene mikrobiote postal del opisa morskih živali. Študije namreč kažejo, da so koncentracije bakterij, ki so povezane z zooplanktonom veliko višje od prostoživečih bakterij. Ti organizmi so v morskem okolju tesno povezani med seboj in ustvarjajo dinamične in kompleksne odnose. Mikrobioto meduze uhatega klobučnjaka so že analizirali in pri tem opazili značilno razliko med bakterijskimi združbami pri različnih življenjskih stadijih tega klobučnjaka. Vendar pa veliko o vlogi teh bakterij ni znanega, zato je to zanimivo področje za preučevanje (Tang in sod., 2010; Weiland-Bräuer in sod., 2015).

1.2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je bil z različnimi metodami oceniti vpliv različnih stadijev, predvsem polipov uhatega klobučnjaka, na posamezne člene prehranske verige, s poudarkom na mikrobni populaciji in procesih mikrobne zanke.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Naše osnovne hipoteze so:

- 1 Na privzem hrane uhatih klobučnjakov vpliva razpoložljivost in vrsta hrane.
- 2 V različnih razvojnih stadijih uhatega klobučnjaka je privzem hrane različen.
- 3 Polipi in efire lahko vplivajo tudi na delovanje in strukturo mikrobne zanke.
- 4 V sluzi na površini polipov so prisotni mikroorganizmi, ki jih bomo lokalizirali z mikroskopijo.
- 5 S histološkimi in SEM analizami bomo ugotovili značilnosti v zgradbi prebavila (gastroderma) in integumenta (ektoderma) polipov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS VRSTE UHATI KLOBUČNJAK *Aurelia aurita* s.l.

2.1.1 Uvrstitev uhatega klobučnjaka v sistem

Uhati klobučnjak - *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) je ožigalkar iz razreda klobučnjakov (Scyphozoa). S svojimi varietetami je najbolj razširjena vrsta klobučnjakov, ki jo lahko najdemo v obalnih vodah (Kramp, 1961). *Aurelia* je morfološko in ekološko zelo raznolik rod, ki vključuje vrste s trenutno nejasnim taksonomskim statusom. Mayer je leta 1910 opisal več kot 10 vrst in varietet rodu *Aurelia*, medtem ko Kramp (1961) navaja 7 vrst. V Svetovnem registru morskih vrst WoRMS (ang. World register of marine species) najdemo dve veljavni vrsti: *Aurelia limbata* in *Aurelia aurita* (WoRMS, 2016). Vendar pa obstajajo nesoglasja med morfološkimi in molekularnimi razmejitvami vrst rodu *Aurelia*. Molekularne analize kažejo, da vrsta uhati klobučnjak (*Aurelia aurita*) vsebuje predstavnike vsaj desetih genetsko ločenih vrst (Dawson, 2003). Ramšak in sodelavci (2012) omenjajo za območje Jadrana 2 kriptični vrsti in sicer *Aurelia* sp. 8 ter *Aurelia* sp. 5, ki je omejena na jezeri otoka Mljeta. Skozi zgodovino preučevanja uhatega klobučnjaka so se znanstveniki ravnali po različnih taksonomskih dognanjih, zato do sistematske revizije celotnega rodu uporabljamo *Aurelia aurita* s.l. (sensu lato).

Preglednica 1: Taksonomska uvrstitev uhatega klobučnjaka (ITIS, 2016).

kraljestvo:	Animalia (živali)
podkraljestvo:	Radiata
deblo:	Cnidaria - ožigalkarji (Hatschek, 1888)
razred:	Scyphozoa - klobučnjaki (Götte, 1887)
podrazred:	Discomedusae
red:	Semaeostomeae - zastavičasti klobučnjaki
družina:	Ulmaridae (Haeckel, 1880)
poddružina:	Aureliinae (L. Agassiz, 1862)
rod:	<i>Aurelia</i> (Lamarck, 1816)
vrsta:	<i>Aurelia aurita</i> (Linnaeus, 1758)

2.1.2 Razvojni krog in ekologija življenjskih faz uhatega klobučnjaka

Klobučnjaki imajo kompleksen življenjski cikel, ki vključuje planktonsko meduzo, sposobno spolnega razmnoževanja in bentoški polip, ki predstavlja nespolno generacijo. Po oploditvi se zigota z brazdanjem preobrazi v blastulo in nato gastrulo ter se razvije v majhno omigetalčeno ličinko, planulo. Ličinke klobučnjakov prosto plavajo, vendar se kmalu, v 1-10 dneh, pritrdijo na primerno površino, navadno na spodnjo stran senčne površine (Holst in Jarms, 2007). Tu se nato preobrazijo v polip imenovan skifostoma, ki se samostojno hrani takoj, ko razvije lovke in ustno odprtino. Naravni habitati polipov uhatega klobučnjaka so lupine živih klapavic in ostrig, trdi kozolnjaki, cevke mnogoščetincev in postranic, raki vitičnjaki, skale, kamni in rjave in zelene alge (Miyake in sod., 2002; Lucas in sod., 2012). Ličinke uhatega klobučnjaka se v laboratoriju pogosteje pritrdijo na plastiko na steklo, les ali beton. Različne vrste klobučnjaških ličink imajo preferenco do nekaterih vrst podlage, kar je verjetno povezano s strukturo biofilmov, ki se lahko razvijejo na teh podlagah (Holst in Jarms 2007).

Pri večini zastavičastih klobučnjakov traja razvoj iz planule v polip s štirim lovkami le 24 ur. Po 2-5 tednih po pritrditvi polip do konca zraste in razvije preostale lovke. Polipi so dolgoživi in laboratorijske študije so pokazale, da lahko živijo kar nekaj let (Lucas in sod., 2012). V naravnem okolju so izpostavljeni biotskim in abiotskim dejavnikom, ki lahko vplivajo na njihovo dolgoživost in preživetje. To so razpoložljivost hrane, plenilci in vpliv temperature, slanosti, hipoksije, pH, onesnaženja, svetlobe ter zamuljevanje. Glavni plenilci klobučnjaških polipov so gološkrgarji iz superdružine *Aeolidioidea*, ostali neselektivni plenilci pa so nekateri drugi polži, deseteronožci in nogači (Takao in sod., 2014). Veliko podlag, kjer so pritrjeni polipi je tudi dom drugih sesilnih organizmov, kot so klapavice, raki vitičnjaki, mnogoščetinci, polipi trdoživnjakov, spužve, kozolnjaki in manjše makro alge, zato je v takih habitatih visoka kompeticija za hrano in prostor (Lucas in sod., 2012). Klobučnjaški polipi imajo mnogo prilagoditev, ki jim dajejo prednost v takih okoljih (poglavje 2.2).

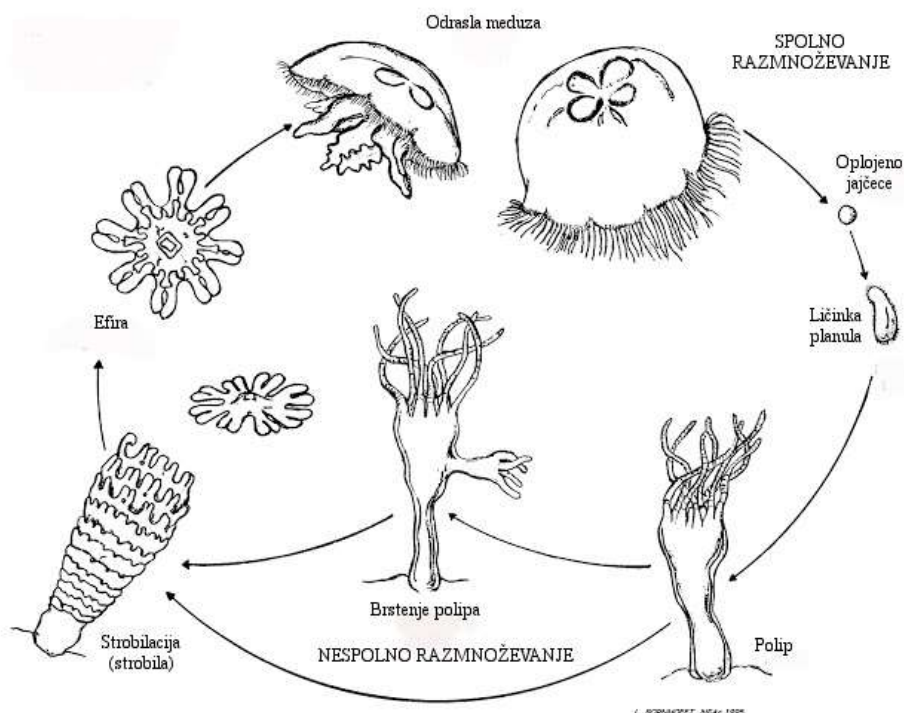
Polip se ob primernih dražljajih okolja v procesu transverzalne fisije preobrazi v strobilo (Lucas in sod., 2012). Strobilacija je segmentacija telesa polipa, ki se prične na apikalnem delu polipa in se nadaljuje v smeri proti pedalnem disku (Fuchs in sod., 2014). V laboratoriju lahko strobilacija poteče v manj kot 2-3 tednih po pritrditvi, v naravi pa večina klobučnjaških polipov strobilira šele mesece po pritrditvi ličinke in preobrazbi v polip (Lucas in sod., 2012). Klobučnjaki iz rodu *Aurelia* pri strobilaciji sprostijo veliko diskom podobnih segmentov, efir, največje opaženo število le teh je 18 (Malej in sod., 2012).

Pri uhatemu klobučnjaku se metamorfoza pri populacijah, ki živijo v zmernem podnebnem pasu prične jeseni ali zgodaj spomladi. Tako lahko pri polipih v ugodnih temperaturnih razmerah v Sredozemlju opazimo strobilacijo in razvoj meduze dvakrat letno (Dawson in Martin, 2001). V Luki Koper poteka strobilacija le v mesecih od novembra do februarja, največji delež polipov strobilira novembra pri temperaturi 15°C in slanosti 35 (Sp) (Malej

in sod., 2012). Polipi, ki jih najdemo v subtropskih in tropskih morjih strobilirajo skozi vse leto, polipi v borealnem podnebju pa le enkrat letno. Tudi temperature, ki sprožijo strobilacijo polipov, se pri različnih populacijah *Aurelia* sp. po svetu razlikujejo (Schroth in sod., 2002). Poleg tega se populacije polipov po svetu razlikujejo tudi po drugih lastnosti kot so velikost, učinkovitost in stopnja vegetativnega razmnoževanja (Schroth in sod., 2002), stopnja respiracije, rasti, prebave in utripanja. To vse so prilagoditve, ki lahko odražajo ekološko adaptacijo na lokalne dejavnike okolja in/ali prisotnost kriptičnih vrst (Dawson in Martin, 2001).

Znanstveniki predvidevajo, da je padec temperature signal za pričetek strobilacije pri polipih. Tako lahko v laboratoriju sprožimo strobilacijo z nižanjem temperature vode za nekaj stopinj. Pri sevu *Aurelia aurita* Roscoff je transformacijo polipa v strobilo sprožil padec temperature iz + 18 ° C na + 10° C. Po treh tednih inkubacije pri nižji temperaturi približno 25 % polipov kaže prve morfološke znake metamorfoze (Fuchs in sod., 2014). Že dolgo je znano, da imajo tudi jodirane molekule, pomembno vlogo pri indukciji strobilacije. Tiroksin je pri uhatem klobučnjaku prisoten le v strobilirajočih polipih, kar nakazuje, da je vključen v diferenciacijo novih struktur, ki poteka med procesom strobilacije (Spangenberg, 1974). Na stopnjo strobilacije vpliva tudi svetloba in prisotnost hranil (Arai 1997). Pred kratkim je bil odkrit transkripcijski faktor, ki je vpleten v transformacijo polipa v strobilo ter protein, ki je prekurzor hormona strobilacije (Fuchs in sod., 2014).

Po zaključku metamorfoze prične efira, ki se še drži strobile, pulzirati ter se tako sprosti v okolje, kjer prične samostojno planktonsko življenje in se postopoma razvije v odraslo meduzo (Arai, 1997). Ta v primerjavi s polipom ni dolgoživa, temveč v večini habitatov živi 4 do 8 mesecev (Lucas, 2001). Meduze uhatega klobučnjaka so v severnem Jadranu navadno prisotne med februarjem in junijem (Malej in sod., 2012). Po sprostitvi zadnje efire, se strobila preobrazi nazaj v polip. Poleg strobilacije se uhati klobučnjak lahko nesporno razmnožuje še z brstenjem iz telesa, s cepitvijo ali brstenjem iz stolonov. Polip proizvaja tudi hitinske podociste, ki ga ščitijo pred kratkotrajnimi obdobji pomanjkanja hrane in plenilskimi gološkrjarji ter prav tako služijo nespolnemu razmnoževanju (Lucas in sod., 2012). Ličinka uhatega klobučnjaka se v nekaterih primerih direktno razvije v efiro in se pri tem le za kratek čas pritrdi na podlago (Arai, 1997).



Slika 1: Življenjski cikel uhatega klobučnjaka; poleg brstenja in strobilacije poznamo tudi druge načine nespolnega razmnoževanja uhatega klobučnjaka – s stoloni, podocistami (prirejeno po Bornhofft, 2016).

2.2 MORFOLOGIJA/HISTOLOGIJA RAZLIČNIH ŽIVLJENJSKIH FAZ UHATEGA KLOBUČNJAKA S POUDARKOM NA GASTROVASKULARNEM SISTEMU

2.2.1 Morfologija polipa ter efire

Klobučnjaški polip je četverno someren, ima oralno čašo in pecelj, ki je s pedalnim diskom pritrjen na podlago. Polip v premeru meri 1 do 3 mm in je blede bele barve, po hranjenju pa se lahko zaradi prehrane obarva oranžno. Čaša vključuje oralni disk iz katerega ob robu izrašča venec lovčk, ki jih je lahko do 24. V sredini čaše je ustna odprtina, ki se odpira v gastralno votlino polipa. Od oralnega diska se po notranjosti raztezajo štiri septe, ki segajo do baze čaše. Čutilni organi pri polipih niso razviti, vendar se le ti vseeno odzivajo na dražljaje iz okolja preko čutilnih celic, ki so razporejene po telesu. Polip uhatega klobučnjaka ima razvita močna longitudinalna mišična vlakna, ki tečejo ob vsakem septumu čaše do peclja ter radialno mišico v oralnem disku. V epidermisu lovčk so longitudinalne mišice, ki omogočajo vpoteg k ustom. Nevroni so prisotni v epiteliju lovčk, oralnega diska in v mišičnih vlaknih. Pri klobučnjaških polipih so serozne celice, ki izločajo prebavne encime skoncentrirane na vzdolžnih septah (Chapman 1973; Spangenberg, 1964; Arai, 1997).

Efire uhatega klobučnjake imajo osem robnih krp, ki vsebujejo radialne kanale na koncu katerih so čutilni organi, ropaliji. Imajo že razvit 4-delni želodec in manubrij (Arai, 1997).

2.2.2 Morfologija in histologija meduze

Kramp (1961) opisuje uhatega klobučnjaka kot meduzo s premerom klobuka do približno 400 mm z 8 širokimi robnimi ustnimi krpami. Ustna ramena so pri tej meduzi dolga toliko kot je premer osnovnega diska, ki je debel in trden ter ima gosto narezane robove s številnimi majhnimi lovki. Čutilne organe ima v plitvih ugreznitvah, ustna odprtina pa je nameščena centralno. Meduza je barvno raznolika a največkrat mlečno bele barve, gonade so vidne skozi prosojno telo in se nahajajo v gubah stene spodnjega dela klobuka - subumbrele.

Eksumbrela odraslega uhatega klobučnjaka je pokrita z bradavicam podobnimi izrastki, ki merijo 45-55 μm v premeru. Eksumbrela, lovke in notranja površina ustnih ramen so gosto pokrite z migetalkami, medtem ko je subumbrela slabše strukturirana z le nekaj migetalkami. Notranjost gastralne votline je pokrita s prstastimi resicami (vili), dolžine približno 320 μm . Apikalni deli so pokriti z mnogimi migetalkami, medtem ko so bazalni deli porasli z vezikularnimi strukturami (Heeger in Möller, 1988).

Gastrovaskularni sistem je pri meduzah klobučnjakov sestavljen iz centralnega želodca, ki je obdan z želodčnimi vrečami in/ali sistemom kanalov. Večina vrst klobučnjakov ima gastralne cire oz. gastralne filamente, ki jih sestavlja sredica iz mezogleje in gastrodermalne celice na površini. Gastrodermis gastralnih cirov vsebuje mukusne in serozne sekretorne celice (Arai 1997). Pri meduzi uhatega klobučnjaka so mukusne celice, ki izločajo sluz prisotne povsod v epidermisu, še posebej zgoščene pa so na apikalnem delu cirov. Serozne celice so skoncentrirane na bazalnem delu cirov, kjer lahko njihov izloček učinkovito deluje na ujeti plen (Heeger in Möller, 1987)).

2.3 PREHRANJEVANJE IN PREBAVA UHATEGA KLOBUČNJAKA

2.3.1 Prehrana polipov, efir in meduz

Polipi klobučnjakov v naravi pri prehrani niso selektivni. Prehranjujejo se s ceponožnimi raki, mehkužci, ribjimi ličinkami in planulami in tudi plenom večjim kot so oni sami (Lucas in sod., 2012). Hranijo pa se tudi z manjšimi organizmi kot so migetalkarji (Kamiyama, 2011). V laboratoriju so polipe uhatega klobučnjaka uspešno hranili predvsem z navpliji solinskega rakca (*Artemia* sp.) pa tudi s ceponožci, ličinkami mehkužcev in rib ter planulami in polipi drugih vrst klobučnjakov (Arai, 1997).

Eksperimentalne študije efir uhatega klobučnjaka so pokazale, da se hranijo z manjšim zooplanktonom, navpliji rakov vitičnjakov in solinskimi rakci, ličinkami rib ter kotačniki, mlajše efire tudi s fitoplanktonom. Efira lahko zaužije in prebavi tudi delce organske snovi (POM- ang. particulate organic matter), vendar ima po takem prehranjevalnem režimu nižjo stopnjo rasti, kot sicer. Učinkovitost plenjenja je močno odvisna tako od velikosti

plena, kot tudi od sposobnosti plena, da pobegne (Sullivan in sod., 1997; Båmstedt in sod., 2001; Riisgård in Madsen, 2011).

Meduza uhatega klobučnjaka je primarno mesojeda in je oportunistični taktilni plenilec (Ishii in Tanaka, 2001). Prav tako kot polip se hrani z zooplanktonom kot so ceponožci, razne nevretenčarske ličinke, ribja jajčeca in ličinke, repati plaščarji, praživali, druge meduze, gliste, kotačniki, rebrače in ščetinočeljustnice. Uhati klobučnjak lahko zaužije tudi nekaj fitoplanktona, ki pa v primerjavi z zooplanktonom ni tako pomemben vir prehrane (Arai, 1997).

2.3.2 Plenenje in prebava polipov, efir in meduz

Uhati klobučnjak ima kot drugi ožigalkarji posebne znotrajcelične organele, knide (nematociste). Sestavljene so iz kolagenske kapsule, ki vsebuje zavito cevko, ki se sproži ob ustreznem dražljaju. Njihova glavna funkcija je plenenje in obramba pred plenilci. Pojavijo se že v razvojni fazi planule in so prisotne skozi ves življenjski cikel. Prisotne so na skoraj vseh delih telesa, skoncentrirane pa so na lovkah, v bližini ust in na gastralnih cilih. Med sprožitvijo večina nematocist vbrižga različne substance, kot so inertne tekočine, soli in toksini, ki imajo različne negativne posledice na biološke sisteme. Nematociste lahko poleg tega vbrižgajo tudi prebavne encime v globlja tkiva paraliziranega plena (Arai, 1997).

Polipi uhatega klobučnjaka plen ujamejo z lovkami. Posamezne lovke se nato skrčijo in upognejo, tako da ponesejo plen k ustom (Arai, 1997). V gastralni votlini se ustvari ciliarni tok, ki omogoča potovanje delcev hrane navzdol proti robovom sept, kjer se plen prebavi. Tok se po prebavljanju obrne, kar omogoči iztrebljanje odvečnih produktov (Chapman, 1973). Ostanke hrane v procesu razgradnje, ki se zadržujejo v gastralni votlini in okrog baze polipa, lahko povzročijo smrt polipa, saj ciliarni tok ne izvrže vedno vseh ostankov hrane. To je eden od razlogov, da polipi visijo s podlage obrnjeni navzdol, saj tako gravitacija pripomore k iztrebljanju (Holst in Jarms, 2007)

Pri meduzi se plen najprej pritrdi na površino meduze. To se zgodi zaradi lepljive sluzi, ki jo prekriva ali delovanja knid. S ciliarnimi tokovi se ujeti plen pomika proti robu klobuka. S krčenjem lovk nato pride v stik z ustnimi rameni (Heeger in Möller, 1987). Tam se nato skupki sluzi in delcev hrane s pomočjo ciliarnih tokov ustnih ramen pomikajo proti gastralni votlini. Pred razvojem ustnih ramen in lovk, se hranjenje efire uhatega klobučnjaka razlikuje od hranjenja odraslih meduz. Efira namreč plen ujame na konice robnih krp. Nato ga s pomočjo gibljivega manubrija pobere iz upognjene krpe (Arai, 1997).

Intracelularna prebava se odvija v gastrodermalnih celicah in se prične z endocitozo delcev hrane ter se nadaljuje v prebavnih vakuolah (Arai, 1997). Prebava pri meduzi uhatega klobučnjaka traja od 1 do 10 ur, odvisno od plena (Ishii in Tanaka, 2001). Pri efiri je

povprečni čas prebave pri stalni koncentraciji plena 1,3 ure (Riisgård in Madsen, 2011). Ta čas pa je močno odvisen tudi od temperature vode (Heeger in Möller, 1980).

2.4 MNOŽIČNO POJAVJANJE ŽELATINOZNEGA PLANKTONA V TRŽAŠKEM ZALIVU

2.4.1 Opis Tržaškega zaliva

Delno zaprt Tržaški zaliv je najbolj severni del Sredozemskega morja, ki se v osrednjem delu odpira proti severu v Jadran. Površina zaliva znaša približno 600 km², volumen pa je ocenjen na približno 9,5 km³. Z nekaj izjemami, globina vode ne presega 25 m in le 10 % zaliva je plitvejšega od 10 m. Povprečne mesečne temperature se gibajo med 9,2 in 25,0 °C, slanost pa variira med 32,8 in 36,7 (Sp), kar kaže na hitre spremembe v zgornjem delu vodnega stolpca. V letih med 1996 in 2006 so se sezonske povprečne temperature povišale za 0,12 do 0,23 °C na leto, prav tako se je povišala slanost površinskih slojev Tržaškega zaliva (Malačič in sod., 2006). Tržaški zaliv lahko ovrednotimo kot oligotrofno in na nekaterih delih zmerno eutrofno področje, kar velja predvsem za notranje dele Koprškega zaliva (Turk in sod., 2007).

2.4.2 Masovni pojavi želatinoznega planktona

Masovni pojavi želatinoznega planktona so ljudem že dolgo znani in ponavljajoči se dogodki. Med želatinozni plankton, ki se pojavlja v velikem številu uvrščamo klobučnjaške meduze, trdoživnjake iz redu *Siphonophora*, rebrače, salpe, repate plaščarje in ličinke mnogih bentoških živali (Hay, 2006). V Tržaškem zalivu se ponavljajoče masovno pojavljajo uhati klobučnjak (*Aurelia aurita*), kompasni klobučnjak (*Chrysaora hysoscella*), morska cvetača (*Cotylorhiza tuberculata*), mesečinka (*Pelagia noctiluca*) in morski klobuk (*Rhizostoma pulmo*) (Kogovšek in sod., 2010).

V severnem Jadranu imajo pogosti masovni pojavi klobučnjaških meduz velik vpliv na ribogojnice, turizem ter ostale obalne industrije in strukturo prehranskih spletov (Turk in sod., 2007; Purcell in sod., 2007). Veliki roji meduz ovirajo ribolov in mašijo ribiške mreže. Meduze jedo ribja jajca, ličinke ter z ribami tekmujejo za plen. S temi in drugimi dejavnosti lahko roji meduz vplivajo na produktivnost in vzdrževanje ribjih populacij (Hay, 2006).

Sicer združevanje klobučnjakov v roje (»blooms«), včasih ogromnih velikosti in gostot, ni neobičajno in nenaravno. Agregacija planktona je lahko posledica kombinacije fizikalnih okoljskih dejavnikov, kot so tokovi, plimovanje in podobno ter aktivnih odgovorov organizmov. Do masovnih pojavov prihaja v plitkih obalnih habitatih pri meduzah, ki kažejo nekatere skupne lastnosti, kot so prisotnost podocist, strobilacije, efir, ali velikost organizma. Hamner in Dawson (2009) ugotavljata, da so masovni pojavi evolucijska adaptacija nekaterih taksonov meduz. Prednost tvorbe takih agregacij je med drugim

spolno razmnoževanje, saj v njih pogosto pride do stikov meduz pri čemer samci spustijo spermo v mukoznih pramenih (Arai, 1997; Hamner in Dawson, 2009, Dawson in Hamner, 2009).

V zadnjih desetletjih znanstveniki opažajo povečanje nekaterih meduznih populacij v Sredozemskem morju (Brotz in Pauly, 2012). Analiza zgodovinskih podatkov kaže, da se uhati klobučnjak na območju severnega Jadrana pojavlja vsaj od 19. stoletja (Avian in Rottini Sandrini, 1994). Roji so bili opaženi med leti 1986 ter 1989 in še pogostejše po letu 1990. Rojenje meduz uhatega klobučnjaka je nato postal letni pojav (Malej in sod., 2012).

Razlogi za povečevanje pogostnosti teh meduz v severnem Jadranu vključujejo lastnosti, kot so 1) metagenetski življenjski cikel, ki vključuje različne tipe nespolnega razmnoževanja pri polipih in enostavna disperzija planktonskih oblik, 2) nizka vsebnost organske snovi, ki jim omogoča hitro rast med obdobji ugodnih pogojev, 3) hranjenje *ad libitum* ter 4) prilagoditev polipov na neugodne pogoje (Malej in sod., 2012).

Poleg tega so pomembni antropogeni vplivi na morsko okolje. Med temi so višje temperature, ki so posledica podnebnih sprememb. Te lahko pozitivno vplivajo na nekatere vrste meduz v Sredozemskem morju. Analize kažejo prisotnost visokih gostot meduz v toplejših letih. Evtrofikacija povzroča povečevanje števila mikro-zooplanktona v morju, poleg tega lahko zmanjšana bistrost vode in nizke vrednosti raztopljenega kisika ustvarijo razmere, ki meduzam bolj ustrezajo v primerjavi z ribami. Znanstveniki opažajo, da po navadi evtrofikacija povzroči povečanje biomase želatinoznih organizmov, vendar pa vrstna pestrost ob takih dogodkih upade. Pomemben dejavnik, ki povzroča povečanje meduznih populacij v Sredozemskem morju, je tudi prelov rib, s katerim se zmanjša število plenilcev in kompetitorjev meduz. Spremembe hidroloških režimov, kot so jezovi in druge konstrukcije, spreminjajo slanost vode, kar zopet favorizira meduze. Nenazadnje je potrebno omeniti tudi negativen vpliv tujerodnih želatinoznih organizmov. Vse te spremembe so značilne za obalna območja (Purcell in sod., 2007, Kogovšek in sod., 2010, Brotz in Pauly, 2012)

Kljub naštetemu, je dolgoročnih podatkov o masovnem pojavljanju želatinoznega planktona malo, zato so potrebne še mnoge analize, da bi ugotovili povezavo med pojavljanji, okoljskimi spremenljivkami in delovanjem človeka (Condon in sod., 2012).

2.4.3 Vloga polipov pri vzdrževanju meduznih populacij

Polipi igrajo pomembno vlogo pri dolgoročnem preživetju populacij meduz med neugodnimi razmerami, ki so posledica spremenljivost podnebja, motenj zaradi človekovega delovanja, predacije in tekmovanja za prostor in vire. Zaradi nespolnega razmnoževanja tvorijo velike populacije, ki štejejo tudi več tisoč ali milijon polipov, ki lahko preživijo tudi dogodke visoke umrljivosti (Lucas in sod., 2012).

Razvoj obalnih predelov, predvsem gradnja struktur kot so pomoli, doki, marine, valobrani, ploščadi in podobno lahko pripomore k povečevanju meduznih populacij in masovnemu pojavljanju le teh. Te strukture so namreč predstavljajo dodaten habitat za sesilne polipe in so lahko pomemben dejavnik pri globalnem povečevanju masovnih pojavov meduz. Klobučnjaške polipe so našli na vrsti umetnih podlag ob obalah Japonske, Velike Britanije in v Sredozemlju (Duarte in sod., 2012; Makabe in sod., 2014).

Med drugim so polipe uhatega klobučnjaka v zelo velikih gostotah opazili tudi v Luki Koper na ostrigah, pritrjenih na stebre pomolov. Tu so merili sezonsko dinamiko, ki je pokazala, da številčnost in gostota polipov naraščata s povečevanjem temperature ter upada s povečevanjem slanosti (Hočevvar, 2013).

2.5 MIKROBI IN ZOOPLANKTON

Mililiter morske vode vsebuje v povprečju milijon (10^6) bakterij (Azam, 1998). V morskih okoljih prevladujejo bakterije velikosti 0,2 - 1 μm . Kljub svoji majhnosti predstavljajo večino morske biomase in so zaradi hitre rasti in metabolizma pomemben del mikrobnih spletov in določajo kakovost morskega okolja. Igrajo pomembno vlogo pri kroženju ogljika in vseh ostalih elementov v oceanih in morjih in s svojim delovanjem sodelujejo pri strukturiranju ekosistema (Fenchel, 1988; Azam in Worden, 2004). Poleg bakterij in ostalih mikroorganizmov je tudi večcelični zooplankton pomemben del pelagične prehranjevalne verige. Kljub temu obe skupini prepogosto proučujemo kot posamezni enoti, povezani le preko kroženja hranil in trofičnih povezav (Azam in Malfatti, 2007; Tang in sod., 2010). Glede na to, da je bilo največ raziskav narejenih o povezavi bakterij z raki, bolj natančno med bakterijami in ceponožci, bom v nadaljevanju predstavila predvsem te odnose. Znano pa je, da simbiotske bakterije najdemo tudi na meduzah (Schuett in Doepke, 2010) ter drugem zooplanktonu in pritrjanje ni omejeno le na rake.

2.5.1 Tipi odnosov med zooplanktonom in bakterijami

Bickel in Tang (2014) sta pokazala, da so lahko koncentracije bakterij povezanih z različnimi vrstami zooplanktona za 2-6 redov velikosti višje od prostoživečih bakterij. Odstotek bakterij, ki so povezane z zooplanktona variira glede na letni čas (Heidelberg in sod., 2002). To kaže, da so povezave bakterij z zooplanktonom ugodne za enega ali oba udeleženca v takem odnosu. Bakterije in zooplankton so lahko tesno povezani preko skupnega pojavljanja in ekoloških funkcij ter ustvarjajo dinamične in kompleksne medsebojne odnose (Tang in sod., 2010).

Raziskovalci ugotavljajo, da so različne zooplanktonske vrste, posebej raki, iz različnih vodnih okolij, gosto kolonizirane z bakterijami (primeri so povzeti v preglednem članku: Tang in sod., 2010). Kakšni so razlogi za kolonizacijo in katere skupine bakterij so povezane z zooplanktonom?

Bakterije v/na telesih zooplanktona najdejo zavetje pred škodljivimi dejavniki iz okolja. To so na primer predacija, virusna liza, škodljivo sevanje in kemikalije. Obratno, tudi zooplanktonski gostitelji lahko uživajo nekatere prednosti takega odnosa, kot so na primer probiotični učinek bakterij v prebavilu ali le dodaten vir hranil. Veliko vrst zooplanktona dnevno migrira gor in dol po vodnem stolpcu, kar pripomore k učinkovitemu prehranjevanju. Med takimi premiki pa je zooplankton v razslojenem vodnem stolpcu izpostavljen različnim bakterijam, ki jih lahko prenese iz enega sloja v drugega. S tem postane medij za širjenje in izmenjavo bakterij na večje razdalje. Nenazadnje bakterije izbirajo bližino zooplanktona zaradi hranilno bogatega okolja, ki jim ga ti nudijo (Malej in sod., 2006, Tang in sod., 2010).

2.5.2 Mikrobi v prebavilu nevretenčarjev

Veliko raziskovalcev poroča o prisotnosti mikroorganizmov v prebavnem traktu pri vodnih nevretenčarjih. Med temi organizmi se vzpostavljajo različni odnosi. Lahko gre za preprost odnos plenilec - plen, kjer igra mikrobiota v prebavilu direkten vir hrane za žival. Vendar pa zaužite bakterije pogosto ostanejo neprebavljene in potujejo skozi prebavilo nespremenjene (Austin in Baker, 1988). Lahko gre za sinergetski odnos, kjer nevretenčar pospeši bakterijsko kolonizacijo z mehansko razgradnjo ali koncentriranjem organske snovi v iztrebkih, bakterije pa razgradijo hrano na tak način, da jo nevretenčar lahko zaužije. Produkcija baktericidnih substanc lahko zavre ali pospeši rast mikroorganizmov, medtem ko lahko mikrobi negativno delujejo na nevretenčarje, kot paraziti ali patogeni. Mikrobi v prebavnem sistemu so lahko prehodne narave (tranzientni po zaužitju) ali stalni prebivalci (rezidenti), ki imajo na gostitelje različne vplive (Harris, 1993).

Pozitivni odnosi med nevretenčarskimi gostitelji in mikrobi vključujejo razgradnjo hranilnih snovi, kar omogoča živalim, da izkoristijo esencialna hranila. Nekateri mikrobi nudijo esencialne gradnike svojim gostiteljem preko fiksacije dušika, sinteze aminokislin ter prispevajo potrebne vitamine. Druge vloge vključujejo pospeševanje ionskega transporta čez steno prebavila, odpornost proti škodljivim substancam zaužitim s hrano ter prispevek encimov (Harris, 1993).

2.5.3 Katere bakterije so vpletene v odnose z morskimi nevretenčarji

Znano je, da bakterije iz razreda *Alphaproteobacteria* prevladujejo v morskih okoljih in s tem tudi z zooplanktonom povezanih bakterijskih skupnostih (Møller in sod., 2007). Bakterije iz razreda *Gammaproteobacteria* imajo sposobnost učinkovitega pritrdjanja na razne površine in kolonizacije, zato so v oceanu nemalokrat vpletene v odnose z različnimi evkariontskimi organizmi (Weiland-Bräuer in sod., 2015). Rezultati sezonskih analiz 16S rRNA klonskih knjižnic kažejo, da v Tržaškem zalivu prisotne alfavroteobakterije, gamaproteobakterije, bakteroidete in cianobakterije (Tinta, 2011). Iz prebavila solinskega rakca *Artemia* sp. so bili med drugim izolirani bakterijski rodovi *Halomonas*, *Vibrio* in *Salinivibrio* (Tkavc, 2012). V črevesni mikrobioti laboratorijsko gojenega ceponožca

Acartia tonsa prevladuje rod *Vibrio*, prisotne pa so tudi bakterije iz rodov *Pseudomonas* in *Cytophaga*, vendar ta dva rodova nista specifično povezana s prebavilom (Sochard in sod., 1979).

2.5.4 Mikrobiota uhatega klobučnjaka

Mikrobioto meduz uhatega klobučnjaka so v preteklosti že poskusili izolirati. Pri tem so določili predvsem bakterije iz rodu *Pseudomonas*, *Achromobacter* in v manjšem obsegu *Micrococcus* (Colwell in Liston, 1962, cit. po Doores in Cook, 1976). Pred kratkim pa so znanstveniki iz Nemčije s pomočjo molekularnih metod (FISH – ang. Fluorescence *in situ* Hybridization in sekvenciranje tarčnega odseka 16S rRNA gena) preučevali sestavo bakterijskih združb povezanih z uhatim klobučnjakom pri različnih stadijih, populacijah ter posameznih delih organizma. Ugotovili so, da je celotna površina epitelijskega polipa uhatega klobučnjaka pokrita z bakterijami, ki se pritrdijo in kopičijo v sluzi. Tu so najpogostejše gamaproteobakterije in *Mycoplasma* sp. (deblo *Firmicutes*), ki so jo zaznali s specifično oligonukleotidno sondo v in med celicami gostitelja, tudi po predhodni uporabi antibiotikov. Na podlagi tega odkritja predvidevajo, da je bakterija endosimbiont polipa uhatega klobučnjaka (Weiland-Bräuer in sod., 2015).

Podobno kot pri polipih uhatega klobučnjaka, tudi epitelij hidre naseljuje kompleksna in dinamična združba mikrobov, ki predstavlja rezidentno mikrobioto in ne le naključno prisotnih mikrobov (Fraune in Bosch, 2007).

Mikrobiota uhatega klobučnjaka se razlikuje od bakterijske združbe okolišnje vode. Opazili so tudi določene razlike v bakterijski združbi v različnih stadijih življenjskega cikla. Mikrobiota polipa se namreč bistveno razlikuje od mikrobiote drugih stadijev, udeleženih v strobilaciji. Analiza sekvenc izbranega odseka polipa je pokazala, da so prisotne bakterije iz rodov: *Lacinutrix*, *Phaeobacter* in *Crenothrix*. Pri strobilirajočih polipih so bile prisotne bakterije rodov *Crenothrix*, *Vibrio* in *Rhodococcus*, pri efirah *Crenothrix*, *Pseudoalteromonas*, *Loktanella* in *Salinibacterium* in mladih meduzah *Lacinutrix*, *Labrenzia*, *Loktanella*, in *Vibrio*, medtem ko sta bili najpogostejši bakteriji v okoljni vodi *Alteromonas* in *Marivita* (Weiland-Bräuer in sod., 2015).

Poleg tega so pri odrasli meduzi v različnih delih telesa (na sluzi eksumbrele in v gastralni votlini) našli taksonomsko raznolike bakterijske združbe. Primerjava polipov različnih populacij, ki so jih gojili v enakih razmerah dlje časa, je pokazala značilno združbo populacije, najverjetneje zaradi genetskega ozadja gostitelja (Weiland-Bräuer in sod., 2015). To je dokaj novo odkritje, glede na predvidevanja, da mikrobiota meduze odraža mikrobioto zaužite planktonske hrane ali okoljske vode (Doores in Cook, 1976).

2.6 VPLIV KLOBUČNJAKOV NA MIKROBNO ZANKO

Že Shick je leta 1975 ugotovil, da polipi uhatega klobučnjaka privzemajo aminokisline pri naravnih koncentracijah, kar prepreči stradanje in tudi pripomore k strobilaciji. Tudi nekateri klobučnjaki lahko privzemajo raztopljeno organsko snov, neposredno iz morske vode. Efire *Aurelia labiata* lahko po privzemu DOM povečujejo svojo biomaso (Skikne in sod., 2009). Kljub temu pa Fenchel ugotavlja (1988), da zaradi nizke količine DOM v morski vodi, višji organizmi verjetno ne morejo asimilirati zadostnih količin DOM za rast. Tega pa lahko uporabijo pritrjene ali celo prostoživeče bakterije in na ta način dosežejo visoke stopnje rasti (Tang in sod. 2010). Efire hranjene z DOM ne rastejo, zgubijo na masi in kažejo podobne morfološke in fiziološke spremembe kot stradane efire (Skikne in sod., 2009).

Meduze s hranjenjem, iztrebljanjem in produkcijo sluzi sproščajo DOM in anorganska hranila v okolje. Organska snov vpliva na metabolizem in rast bakterij in s tem prenos ogljika in energije na višje trofične nivoje v mikrobni zanki in prehranskem spletu. Spremeni se lahko vrstna sestava bakterijske združbe in posledično struktura mikrobne zanke. Do spremembe bakterijske združbe prihaja tudi v procesih razgradnje biomase uhatega klobučnjaka, ko prevladajo bakterije iz skupine Gammaproteobacteria, iz družine Vibrionaceae, preostalo pa so bakterije iz razreda *Flavobacterium* (Condon in sod., 2010; Tinta in sod. 2010; Tinta in sod., 2012).

2.6.1 Trofične interakcije med uhatim klobučnjakom in mikrobno zanko

Heterotrofni del mikrobne prehranjevalne zanke vključuje več trofičnih nivojev, ki povezujejo mikrobe z višjimi živalmi. Večji protisti, ceponožci in drugi planktonski mikrofagi so pomembni plenilci nanoflagelatov, ti pa so glavni bakteriovorori. Kljub mnogim dokazom, da se meduze lahko prehranjujejo z mikrozooplanktonom, je le malo znanega o posrednih trofičnih interakcijah med različnimi trofičnimi nivoji in mikrobno zanko, kot tudi o vplivu na druge mikroorganizme prehranskega spleta (Malej in sod., 2006; Turk in sod., 2008). Še manj pa je znanega o vplivu klobučnjaških polipov na ta pomemben del prehranjevalnih spletov.

Raziskava Malej in sodelavcev (2006) kaže, da imajo meduze uhatega klobučnjaka poleg neposrednega vpliva na mikro- in mezozooplankton, tudi pomemben posredni vpliv na mikrobni del planktona. V primeru, ko so bile v zaprtem sistemu v morju poleg mikro- in mezozooplanktona prisotne tudi meduze uhatega klobučnjaka, je bila bakterijska biomasa in bakterijska produkcija ogljika višja, kot v eksperimentalnem sistemu brez meduz. To nakazuje na spremembe trofičnih povezav zaradi predacije bakteriovorov ter s tem zmanjšanje njihovega števila in vpliva na bakterijsko biomaso, ki pa se lahko istočasno povečuje tudi zaradi sproščenih večjih količin DOM. Poleg tega eksperiment z radioaktivno označenimi bakterijami kaže, da lahko manjši ceponožci, ki so sicer pomemben vir prehrane meduz, zaužijejo skupke bakterij, kar potrjuje kaskadni prenos

energije na višji trofični nivo (bakterije-zooplankton-meduze) (Malej in sod., 2006; Turk in sod., 2008).

2.7 VLOGA SLUZI OŽIGALKARJEV

Večina interakcij med uhatim klobučnjakom in potencialnimi kolonizatorji, se podobno kot pri drugih živalih, dogaja na mukozni površini, ki je nekakšna pregrada med živaljo in okolico. Bakterije, ki razkrajajo sluz, imajo v tej niši prednost, saj je le ta bogata z glikoproteini. Bakterije s posebnimi encimi, glikozidazami, sulfatazami in sialidazami, razgradijo različne glikane, ki so prisotni v sluzi (Ouwerkerk in sod. 2013, Sperandio in sod., 2015).

Sluz na površini meduz vsebuje veliko mucinov, ki spadajo v družino glikoproteinov in vsebujejo velike količine O-povezanih oligosaharidov. Ti prispevajo k viskozno-elastičnim lastnostim sluzastih izločkov in zagotavljajo zaščito epitelnih površin pred dehidracijo, invazijo mikrobov in mehanskimi poškodbami (Watanabe, 2002). Leta 2007 so izolirali nov mucin, qniumicin, značilen za meduze (Masuda in sod. 2007). Analiza sestave sluzi meduze rodu *Aurelia*, kaže da ta vsebuje 73 % proteinov, 5 % polisaharidov, 27 % maščob in 22 % pepela (Ducklow in Mitchel, 1979).

Sluz lahko služi kot kemična obramba pred plenilci (Shanks in Graham, 1988). Hanoaka in sodelavci (2001) so opazili posebno vedenje nekaterih meduz, ob izločanju sluzi. Večje količine sluzi meduz se izločijo ob določenih motnjah v okolju, sluz pa je lahko za nekatere organizme strupena. V tej sluzi so opazili sprožene kot tudi nesprožene nematociste.

Poleg tega ima lahko sluz nekaterih ožigalkarjev antimikrobne lastnosti, ki je odziv na zaščito proti morebitni bakterijski okužbi (Kasahara in Bosch, 2003). Iz mezogleje uhatega klobučnjaka so izolirali antimikrobni peptid aurelin, ki kaže aktivnost proti Gram-pozitivnim in Gram-negativnim bakterijam (Ovchinnikova in sod. 2006). Fredrick in Ravichandran (2010) sta odkrila, da ekstrakt centralnega diska meduze *Porpita porpita* učinkuje tako proti nekaterim bakterijskim kot tudi glivnim sevom. Po drugi strani pa Morales-Landa in sodelavci (2007) niso našli nobene antibakterijske aktivnosti v ekstraktih (koncentracija $0,01 \text{ mgL}^{-1}$) šestih ožigalkarjev, od tega dveh meduz klobučnjakov. Antimikrobni peptidi lahko vplivajo na število mikrobov ter tudi na spremembe v sestavi mikrobiote ter na ta način uravnavajo tudi bakterijsko združbo v fazah embrionalnega razvoja (Fraune in sod., 2010).

Poleg antimikrobnih snovi so v tkivih klobučnjakov zaznali visoko antioksidativno aktivnost ter veliko spojin, ki so zanimive za uporabo v prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji. To so na primer kolagen, peptidi in druge bioaktivne molekule (Leone in sod., 2015).

3 MATERIAL IN METODE

V prvem delu naloge smo za analizo zgradbe ter preverjanje prisotnosti sluzi in mikroorganizmov v preparatih polipov uhatega klobučnjaka uporabili optično mikroskopijo in vrstično ter presevno elektronsko mikroskopijo. V drugem delu naloge smo poskušali oceniti vpliv različnih življenjskih stadijev uhatega klobučnjaka (polipov in efir) na posamezne člene prehranske verige ter na mikrobn populacijo in procese mikrobne zanke. Pri tem smo zasnovali poskuse, kjer smo uporabili tehnike štetja bakterij s pretočno citometrijo in fluorescentno mikroskopijo ter s tritijem označene bakterije.

3.1 VZORČENJE POLIPOV NA TERENU

Polipe uhatega klobučnjaka (*Aurelia aurita*) smo vzorčili v notranjosti Koprškega zaliva. Polipi so pritrjeni na lupine ostrig, ki jih najdemo na podpornih stebrih terminala TRT Luke Koper (slika 2). Lupine ostrig s polipi (34 ostrig) smo nabrali 3. 9. 2014 in 24. 3. 2015. Ostrige sta potapljača vzorčila na globini 3,5 m.



Slika 2: Vzorčenje polipov na terenu; A: mesto vzorčenja, terminal TRT Luke Koper; B: primer ostrige z enega od stebrov, kjer so prisotni polipi (Foto: Tihomir Makovec).

3.2 VZDRŽEVANJE IN HRANJENJE POLIPOV

Ostrigam, na katerih so bili pritrjeni polipi smo s skalpelom odstranili meso in odmrli material, tako da je ostala le lupina s polipi. Ostrige smo nato pritrdili na vrvice ter jih obesili na plastične palice, ki smo jih namestili nad akvarij z morsk vodo. S tem smo omogočili, da so lupine visele v vodi pravokotno na dno, s čimer so imeli polipi podobno lego kot v naravnem habitatu. Vzpostavili smo pretočni sistem z morsk vodo iz Piranskega zaliva ter s kamenčkom za prezračevanje v sistem vnašali kisik (slika 3A). Temperatura vode med gojenjem polipov je bila odvisna od takratne temperature morja.

Uporabljen material:

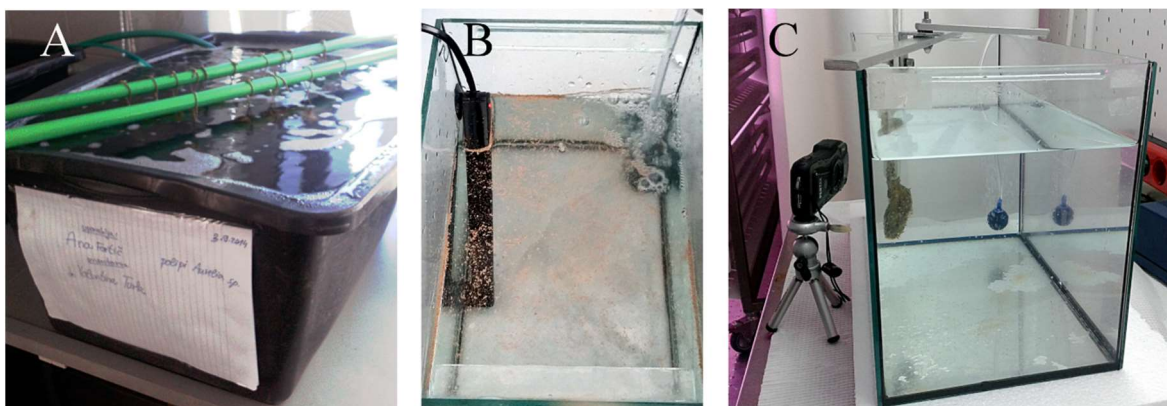
- jajca solinskega rakca (*Artemia Pur*, JBL, Nemčija),

- morska voda,
- skalpel,
- plastične palice,
- plastični akvarij,
- stekleni akvarij,
- vrvce in elastike,
- kamenček za prezračevanje,
- akvarijski grelec.

Za potrebe hranjenja polipov smo priskrbeli jajčeca solinskega rakca *Artemia* sp., ki se komercialno uporabljajo za hranjenje ribjih mladice. Jajčeca smo dodali morski vodi v steklenem akvariju pri temperaturi 23 °C, pri tem smo si pomagali z akvarijskim vodnim grelcem in poskrbeli za prezračevanje (slika 3B). Po 2-5 dneh so se iz jajčec izlegli navpliji, te smo nato *ad libitum* ponudili polipom na ostrigah. Hranjenje je potekalo 3 ure v temi oziroma ponoči. Polipe smo hranili enkrat tedensko.

3.2.1 Indukcija strobilacije polipov

Po jesenskem vzorčenju (25. 9. 2014) smo eno ostrigo s številnimi polipi iz plastičnega akvarija s 24 °C predstavili v steklen akvarij v termostatisirani komori pri 15 °C in dnevno-nočnemu režimu pri šibki dnevni svetlobi približno kot v naravnem habitatu (12 h svetlobe in 12 h teme). Nastavili smo fotoaparat, ki je vsakih 30 s posnel fotografijo polipov ter tako spremljali razvoj in strobilacijo polipov (slika 3C).



Slika 3: A - gojenje polipov; B - gojenje ličink solinskega rakca; C - indukcija strobilacije polipov pri nižani temperaturi v termostatisirani komori.

3.3 HISTOLOŠKA ANALIZA POLIPOV UHATEGA KLOBUČNJAKA (*Aurelia aurita* s. l.)

V tem delu naloge smo želeli z različnimi tehnikami priprave histoloških vzorcev in barvanja pregledati telesno strukturo polipov uhatega klobučnjaka. Poleg tega smo želeli preveriti lokacijo in količino sluzi, ki jo izločajo polipi. Pri pripravi histoloških preparatov polipov smo uporabili tri različne tehnike fiksacije, vklapljanja in rezanja polipov:

- fiksacijo v 2% paraformaldehidu, zamrzovanje v mediju v kriomikrotomu in rezanje v kriomikrotomu (poglavje 3.3.1.2.1)
- zamrzovanje v propanu in tekočem dušiku, ter rezanje s kriomikrotomom (poglavje 3.3.1.2.2)
- fiksacijo v 4% paraformaldehidu, vključevanje v parafin in rezanje z mikrotomom (poglavje 3.3.1.2.3).

3.3.1 Priprava histoloških vzorcev polipov

3.3.1.1 Narkotizacija polipov

Uhati klobučnjak ima tako kot veliko nevretenčarjev zelo krčljivo telo in če želimo pri mikroskopiji organizem ohraniti v iztegnjeni obliki, ga je treba narkotizirati (Russel, 1963). V ta namen smo preskusili dve metodi narkotizacije. Pripravili smo toplo kopel z ogljikovim dioksidom kamor smo dodali polipe, s čimer nismo prišli do željenih rezultatov. Nato smo uporabili magnezijev klorid, kar se je izkazalo za uspešno metodo.

Polipom v stekleni čaši z morskovo vodo smo dodali enak delež 7 % magnezijevega klorida heksahidrata v destilirani vodi (razmerje 1:1). Polipi so po nekaj minutah postali manj odzivni na dotik. Po 10 minutah smo tekočino v čaši odpipetirali in jo zamenjali s čistim 7 % magnezijevim kloridom heksahidratom (po Traunšek, 2002).

Uporabljen material:

- destilirana voda in morska voda,
- magnezijev klorid heksahidrat ($\text{MgCl} \times 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma –Aldrich, ZDA)
- steklena čaša,
- Pasteurjeva pipeta.

3.3.1.2 Fiksacija, vklapljanje in rezanje polipov

3.3.1.2.1 Prva tehnika fiksacije polipov (fiksacija 1)

Pri prvi tehniki smo uporabili 3 polipe, ki smo jih fiksirali 2 uri v 2% paraformaldehidu pri 4°C. Fiksativ smo pripravili iz 8 % vodnega paraformaldehida, ki smo ga dvakrat redčili v filtrirani morski vodi. Nato smo fiksativ odstranili in ga nadomestili z destilirano vodo. Po 24 urah smo destilirano vodo zamenjali. Vzorce smo vstavili v nosilce iz aluminijeve folije in jih zalili z zamrzovalnim medijem. Nato smo nosilce z vzorci postavili v delovno območje kriomikrotoma Leica CM 1850 pri temperaturi med – 25 °C in – 21 °C ter pustili 15 minut, da so zamrznili. Vzorce smo rezali na 10 - 14 µm debele rezine in jih s pomočjo čopiča položili na poli-l-lizinska objektna stekelca (pripravljena po protokolu iz Bancroft in Gamble, 2008) pri sobni temperaturi, da so se rezine prilepile na podlago. Stekelca smo

do barvanja shranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Barvali smo na tri različne načine (PAS/DAPI, HE, Alcian modro) Stekelca smo po barvanju prekrili z glicerol-želatino, vodnim medijem za prekrivanje in krovnim stekelcem. Medij smo pripravili iz 30 ml destilirane vode in 5 g želatine, s segrevanjem na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ in dodali 35 ml glicerola. Medij smo hranili pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, pred uporabo pa v vodni kopeli segreli na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pobarvana stekelca smo shranili v hladilniku, pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri uporabi prekrivnega medija z barvilom DAPI glicerol-želatine nismo uporabljali, stekelca pa smo shranili v temi pri sobni temperaturi.

3.3.1.2.2 Druga tehnika fiksacije (fiksacija 2)

Pri drugi tehniki smo uporabili 5 polipov, ki smo jih brez predhodne fiksacije prenesli v nosilce, ki smo jih izdelali iz spodnjih delov mikrocentrifugirk in jih zalili z zamrzovalnim medijem. Te smo nato prenesli v tekoči propan za 10-15 sekund in nato še v tekoči dušik za 10 minut. Vzorce v tekočem dušiku smo nato prenesli v kriomikrotom Leica CM 3050 (Nemčija). Vzorce smo rezali na 20 - 30 μm debele rezine in jih s pomočjo čopiča prenesli na v kriomikrotomu ohlajena poli-l-lizinska objektna stekelca. Med posamezna stekelca smo položili povoščen papir in filter papir, da se rezine niso sprijele. Po končanem delu smo posodico s stekelci zalili s tekočim dušikom in jo prestavili v liofilizator. Tam smo jih pustili 2 dni, ter jih nato prestavili v eksikator za 5 dni, da so se preprati popolnoma posušili. Pred barvanjem smo na preparate nanegli kapljico destilirane vode, da so se ti prilepili na objektnik. Nato smo objektnike posušili pri $40 - 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, da so se preparati prilepili. Po barvanju smo objektnike prekrili z glicerol-želatino ali s prekrivnim medijem z barvilom DAPI ter jih prekrili s krovnim stekelcem ter jih shranili v temi v hladilniku, pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ali pri sobni temperaturi.

3.3.1.2.3 Tretja tehnika fiksacije (fiksacija 3)

Pri tretji tehniki smo uporabili 5 polipov, ki smo jih 2 uri ali 24 ur fiksirali v 4% paraformaldehidu pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Fiksativ smo pripravili iz 8 % vodnega paraformaldehida, ki smo ga enkrat redčili v filtrirani morski vodi. Fiksativ smo nato odstranili, ga nadomestili z destilirano vodo in spirali 15 minut. Nato smo vzorce 15 minut dehidrirali tako, da smo jih zalili s 50 % etanolom ter postopek ponovili dvakrat s 70 % etanolom, nato pa še z 80% etanolom, dvakrat z 90 %, 96% in 100% etanolom. Vzorce smo 15 minut bistrili v ksileni, nato je sledila infiltracija v parafin, prvič za 3 ure, nato smo vzorce prestavili v bolj čist parafin čez noč. Naslednji dan smo vlili parafin v nosilce iz aluminijeve folije in vanje vstavili vzorce, počakali, da se je parafin strdil ter jih rezali z mikrotomom (RM2265, Leica, Nemčija) na 7 μm debele rezine. Te smo s čopičem prenašali na objektna stekelca prekrita z destilirano vodo, ter jih posušili na grelni plošči. Preparato smo barvali z vodotopnimi barvili, zato smo rezine pred nadaljnjo obdelavo deparafinizirali in sicer dvakrat po 3 minute s ksilenom. Sledila je rehidracija, najprej smo preparate dvakrat po 3 minute pustili v propanolu, nato dvakrat po 3 minute v 96% etanolu in 3 minute v 70% etanolu, nakar smo jih še nekajkrat sprali v destilirani vodi. Po barvanju smo na preparate

nanesli prekrivni medij Pertex® ali prekrivni medij z barvilom DAPI ter jih prekrili s krovnikom in shranili v temi pri sobni temperaturi.

3.3.1.2.4 Material uporabljen pri treh tehnikah fiksacije polipov

- paraformaldehid (Sigma –Aldrich, ZDA),
- parafin Paraplast Plus (Kendall, ZDA),
- glicerol,
- želatina,
- absolutni etanol (Sigma –Aldrich, ZDA), po potrebi redčen z destilirano vodo,
- propanol (Merck KGaA, Nemčija),
- tekoči propan,
- tekoči dušik,
- zamrzovalni medij (Tissue freezing medium, Jung Leica, Nemčija),
- prekrivni medij z barvilom DAPI - Fluoroshield™ with DAPI (Sigma – Aldrich, ZDA),
- prekrivni medij Pertex® (Meditate GmbH, Nemčija),
- aluminijeva folija za nosilce,
- čopič,
- povoščen papir in filter papir,
- mikrocentrifugirke,
- objektna in krovna stekelca,
- liofilizator (Christ Alpha 1-4LSC, Christ, Nemčija),
- eksikator,
- termo plošča.

3.3.2 Barvanje parafinskih in kriostatских rezin

3.3.2.1. Klasično histološko barvanje s hematoksilinom in eozinom (HE)

V enakem razmerju smo zmešali komponenti A in B Weigertovega hematoksilina (Bancroft in Gamble, 2008.). Eozin in solni alkohol je bil predhodno pripravljen po protokolu iz Bancroft in Gamble, 2008. Vzorce smo najprej barvali s hematoksilinom 10-15 sekund, nato smo jih sprali z destilirano vodo, prelili s solnim alkoholom in znova sprali z destilirano vodo. Sledilo je barvanje z eozinom (1 min) ter spiranje z destilirano vodo, 70 % etanolom in ponovno z destilirano vodo.

Pri takem barvanju pričakujemo modro vijolično do modro obarvana jedra in rožnato citoplazmo.

3.3.2.2 Barvanje sluzi z barvilom Alcian modrim

Barvilo Alcian modro smo pripravili iz 1 g Alcian modrega in 100 ml 3% očetne kisline. Za barvanje jeder smo pri tej tehniki uporabili Gillov hematoksilin (pripravljen po protokolu iz Bancroft in Gamble, 2008) ali nuclear fast red (pripravljen iz 0,1g nuclear fast red, 100 ml destilirane vode in 5 g aluminijevega sulfata s segrevanjem, filtriranje).

Vzorci smo najprej sprali v vodi, nato inkubirali v 3 % očetni kislini. Nato smo barvali z Alcian modrim (pH 2,5) 30 minut. Objektna stekelca smo spirali pod tekočo vodo 10 minut in jih nato sprali še z destilirano vodo. Sledilo je barvanje jeder z Gillovim hematoksilinom ali barvilom nuclear fast red 5 minut. Vzorci smo nato še trikrat sprali z destilirano vodo (protokol po Cohen in sod., 2012).

Pri takem barvanju pričakujemo modro obarvane predele, kjer so prisotni kisli mukopolisaharidi in rdeča jedra v primeru uporabe barvila nuclear fast red ter vijolična jedra v primeru uporabe Gillovega hematoksilina.

3.3.2.3 Barvanje mukopolisaharidov s postopkom PAS

Pripravili smo 50 ml Schiffovega reagenta. To smo storili tako, da smo 0,5 g bazičnega fuksina in 0,95 g natrijevega bisulfita raztopili v 50 ml 0,15 N klorovodikove kisline (0,6 ml klorovodikove kisline dodamo 50 ml destilirane vode). Pripravljen raztopino smo 2 uri stresali na stresalniku in ji dodali 0,25 g aktivnega oglja. Stresali smo še 1-2 minuti in filtrirali skozi filtrirni papir. Nato smo dodali toliko destilirane vode, tako da smo dobili 50 ml reagenta. Postopek smo ponovili še dvakrat z 0,3 g in 0,7 g aktivnega oglja, dokler raztopina ni bila več obarvana.

Vzorci smo najprej 15 minut oksidirali z 0,5 % vodno raztopino perjodne kisline. Nato smo jih dobro sprali z destilirano vodo. Sledila je 10 minutna inkubacija v Schiffovem reagentu. Za tem smo vzorce 20 minut spirali pod vročo vodo, da so rezine pordečile. Jedra smo barvali s prekrivnim sredstvom s fluorescentnim barvilom DAPI, tako da smo na rezine kapnili 2 kapljici medija, ter jih pokrili s krovnim stekelcem.

Rezultat barvanja so rožnati predeli, kjer so prisotni nevtralni mukopolisaharidi in jedra, ki fluorescirajo modro ob uporabi UV filtrov za DAPI.

3.3.2.4 Barvanje z DAPI

Naredili smo nekaj preparatov polipov, kjer polipov nismo fiksirali in rezali, temveč smo cele ter vzdolžno prerezane prenesli na objektna stekelca ter nanje kapnili kapljico barvila DAPI (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI) in jih prekrili s krovnim stekelcem.

3.3.2.5 Material uporabljen pri barvanju

- komponenti A in B barvila Weigertov hematoksilin (po Bancroft in Gamble, 2008)

- barvilo eozin (po Bancroft in Gamble, 2008)
- barvilo Gillov hematoksilin (po Bancroft in Gamble, 2008)
- 70 % etanol,
- destilirana voda,
- očetna kislina (CH_3COOH),
- barvilo Alcian modro,
- barvilo nuclear fast red,
- aluminijev sulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$),
- bazični fuksin,
- natrijev bisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$),
- klorovodikova kislina (HCl),
- aktivno oglje (JGL, Hrvaška),
- perjodna kislina (H_5IO_6),
- prekrivni medij z barvilom DAPI (Fluoroshield™ with DAPI, Sigma – Aldrich, ZDA),
- barvilo DAPI (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- skalpel,
- objektna in krovna stekelca,
- merilni valji,
- steklene kadičke za barvanje,
- filtrirni papir,
- stresalnik (Heraeus Instruments, Nemčija),
- tehnica (BP 310, Sartorius AG, Nemčija).

3.3.3 Mikroskopiranje in analiza histoloških rezin

Preparate, barvane z fluorescentnim barvilom DAPI smo na pregledovali s fluorescentnim mikroskopom Zeiss AxioImager.Z1 in jih posneli s kamero AxioCam HRc (Zeiss, Nemčija) na Oddelku za biologijo, BF. Najprej smo naredili sliko v svetlem polju in nato še z uporabo živosrebrne žarnice in UV filtrom za DAPI. Na MBP/NIB v Piranu smo pri pregledovanju uporabljali epifluorescentni mikroskop BX51 in kamero XC10 (Olympus, Japonska).

Druge preparate smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom Opton Axioskop, slike smo posneli s kamero Leica DFC290 HD in pri tem uporabili program Leica LAS. Slike smo obdelali v programu Adobe Photoshop CS5 in GIMP 2.8.16.

3.4 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

3.4.1 Priprava vzorcev

Štiri polipe smo narkotizirali po zgoraj opisani metodi (poglavje 3.3.1.1) in jih fiksirali s kombinacijo aldehydov. V 1 mililiter filtrirane morske vode (0,22 µm) smo dodali 40 µl 3 % glutaraldehida in 125 µl 11 % paraformaldehida. En vzorec smo s skalpelom prerezali na pol. Tako pripravljene vzorce smo shranili pri 4 °C. Fiksativ smo petkrat po 3 minute spirali v 0,1 M Na-kakodilatnem pufru (pH 7,2). Vzorce smo naknadno fiksirali s 4% osmijevim tetroksidom 50 minut. Fiksativ smo štirikrat po 5 minut spiraliv vodi miliQ. Sledila je dehidracija vzorcev v etanolni vrsti.

Postopek dehidracije:

50% etanol	3 minute
70% etanol	3 minute
80% etanol	3 minute
90% etanol	3 minute
100% etanol	trikrat 10 minut

Vzorce smo sušili z metodo substitucije s HMDS in uporabili različna razmerja HMDS in 100% etanola.

Postopek sušenja:

HMDS: 100% etanol 2:1	3 minute
HMDS: 100% etanol 1:2	3 minute
HMDS	3 minute
HMDS	3 minute
HMDS	pustimo na zraku, da se posuši

Suhe vzorce smo nato z lepilom s prevodnim koloidom srebra pritrdili na kovinski nosilec. En polip smo pred tem previdno prelomili, tako da smo razkrili notranjost telesa. Ko se je lepilo posušilo smo preparate naprašili s platino v napraševalniku.

Uporabljen material:

- Millex GP filter z 0,22 µm velikimi porami (Merck Millipore, ZDA),
- morska voda,
- glutaraldehyd
- paraformaldehid,
- 0,1 M Na-kakodilatni pufer (pH 7,2),
- osmijev tetroksid (OsO₄),
- miliQ voda,
- absolutni etanol (Sigma –Aldrich, ZDA), po potrebi redčen z destilirano vodo,

- heksametildisilazan - HMDS (Merck Schuchardt OHG, Nemčija),
- lepilo s prevodnim koloidom srebra (Dotite, Silver Print),
- platina,
- napraševalnik kovin (SCD 050, Baltec, Švica).

3.4.2 Opazovanje preparatov s SEM

Preparate smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (JSM-7500F, JEOL, Japonska), pri povečavah od 80 do 9500 x in pospeševalni napetosti 3 kV. Posneli smo cel polip, da smo lahko videli zunanjo površino ter prerezane polipe, kjer je bila vidna gastralna votlina.

3.5 PRESEVNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)

S tehniko negativnega kontrasta smo želeli preveriti prisotnost bakterij na površini in okolni sluzi polipov uhatega klobučnjaka s presevnim elektronskim mikroskopom.

3.5.1 Priprava vzorcev z negativnim kontrastiranjem

Tri polipe smo odstranili z ostrige s priborom, ki smo ga predhodno razkužili s 70 % etanolom. Nato smo jih dvakrat sprali s filtrirano morskovo vodo (filter z 0,22 µm). Pod stereolupo smo dva polipa s skalpelom vzdolžno prerezali in jih prenesli na čisto objektno steklenico, kamor smo dodali 20 µl filtrirane morske vode in 20 µl vode miliQ. Pri teh vzorcih smo z majhno kovinsko žlico postrgali po steni gastralne votline in sluz prenesli na mikroskopsko mrežico. Tudi okolišnja tekočina, kamor bi se lahko sprale bakterije, smo prenesli na mikroskopsko mrežico (20 µl vzorca). Tretji polip smo pripravili tako, da smo najprej s skalpelom odstranili pedalni disk, nato pa dodali filtrirano morskovo vodo in vodo miliQ ter s stekleno palčko pripravili macerat. Na kapljici vzorca smo nato poveznili mrežico. Vse vzorce smo pustili, da se posušijo (5 minut, oz. le nekaj sekund tam, kjer ni bilo veliko tekočine), jih sprali z vodo miliQ in osušili s filtrirnim papirjem. Sledilo je kontrastiranje s 4 % vodnim uranil acetatom, tako da smo na vzorce kanili kapljico kontrastnega sredstva in jih takoj osušili s filtrirnim papirjem. Mrežice smo nato pustili najmanj 1 uro na zraku pri sobni temperaturi, da so se popolnoma posušile.

Uporabljeni materiali:

- 70% etanol,
- Millex GS filter z 0,22 µm velikimi porami (Merck Millipore, ZDA),
- miliQ voda,
- morska voda,
- uranil acetat ($\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
- kovinska žlička,
- mikroskopske mrežice,
- steklena palčka,

- filtrirni papir,
- stereolupa.

3.5.2 Opazovanje preparatov s TEM

Preparate smo si ogledali s presevnim elektronskim mikroskopom Philips CM 100 (Philips, Nizozemska), posnetke pa posneli z digitalno kamero Gatan Orius 200 SC in uporabili programsko opremo Digital Micrograph.

3.6 VPLIV POLIPOV NA NARAVNO POPULACIJO BAKTERIJ

V laboratorijskem poskusu smo testirati vpliv polipov uhatega klobučnjaka na rast morskih heterotrofnih bakterij. Poskus smo izvedli v plošči za celične kulture. V 6 vdolbinic na plošči smo nalili 4 ml morske vode, ki smo jo predhodno filtrirali skozi GF/F filtre (<0,8 μ m). V treh izmed teh vdolbinic smo pustili le vodo, v tri pa smo dodali polipe na kosu ostrige. Na prvem kosu je bilo 14 polipov, na drugem 24 in na tretjem 28 polipov uhatega klobučnjaka. Pred inkubacijo smo vzeli 1,5 ml podvzorca (t_0) iz vsake vdolbinice in nato inkubirali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo ponovno vzorčili (t_{24}). Vse vzorce smo fiksirali s 60 μ l 4 % glutaraldehida in hranili na - 80°C do meritev. V vzorcih smo določali število morskih heterotrofnih bakterij z metodo prilagojeno za pretočno citometrijo:

Vzorce (420 μ l) smo barvali z barvilom SyBR green I (20 μ l 2 % barvila raztopljenega v DMSO), inkubirali 10 minut v temi in nato določili število bakterij v 50 μ l vzorca na pretočnem citometru BD Accuri C6. Pri tem smo uporabili program BD Accuri™ C6 Plus in rezultate odčitati iz dvodimenzionalnega logaritemskega grafa (zaznava z detektorjema FL1-H, FL3-H). Rezultate smo obdelali s programom Microsoft Excel 2013.

Uporabljen material:

- morska voda,
- GF/F filtri iz steklenih mikrovlačen (Whatman, ZK),
- plošča za celične kulture z 12 vdolbinicami (Nunc®), Sigma-Aldrich, ZDA),
- glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, ZDA),
- barvilo SyBR green I 10000-kratni koncentracija v DMSO (Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- pretočni citometer (BD Accuri C6, BD Biosciences, ZDA).

3.7 POSKUSI Z RADIOAKTIVNO OZNAČENIMI BAKTERIJAMI

Da bi ocenili prehranske vire polipov in efir smo izvedli eksperimente z radioaktivno označenimi substrati pri temperaturno in svetlobno kontroliranih razmerah. Pri poskusih smo se oprli na metodo opisano v članku Malej in sodelavci (2006). Testirali smo trofične povezave polipov, efir, ceponožcev in bakterij. Pripravili smo kulture radioaktivno

označenih (^3H) bakterijskih izolatov ali naravne populacije morskih bakterij in spremljali prenos vira na višje trofične nivoje.

3.7.1 Izvedba prvega (preliminarnega) poskusa z radioaktivnim označevanjem

3.7.1.1 Priprava bakterijske kulture označene s ^3H

Pripravili smo ZoBell 2216E agar za gojenje morskih bakterij. Na gojišča smo nacepili bakterijsko kulturo *Halomonas* sp. BF5_0419 (pristopna številka JX865187, GenBank, NCBI), ki je bila izolirana iz morske vode Piranskega zaliva. Kulturo smo inkubirali v temi pri sobni temperaturi 8 dni in jo nato precepili v tekoče gojišče (trikrat po 3 ml) ZoBell 2216E. Sestava tekočega gojišča je bila enaka trdemu, le da nismo dodali agarja. Vsako uro smo merili absorbanco podvorcev s spektrofotometrom pri valovni dolžini 600 nm. Na ta način smo ocenili hitrost rasti bakterij. Po 5 urah, ko je bila rast bakterij v eksponentni fazi (cca 10^6 celic/ml), smo 4 ml kulture dodali 20 μl radioaktivno označenega levцина (^3H –Leu). Takoj za tem smo vzeli 1 μl podvzorca (K_1), ki nam je služil kot kontrola dodanega radioaktivno označenega levцина. Inkubirali smo v temi na sobni temperaturi 21 ur. Nato smo po 1 ml kulture odpipetirali v 4 krioepruvetke, kulturo sprali in odstranili ^3H levcin, ki ni bil asimiliran v bakterijske celice. To smo naredili tako, da smo vzorce centrifugirali 15 minut pri 16.000 obratih na minuto pri 4°C , supernatant aspirirali in peletu dodali 1 ml sterilne morske vode. Postopek spiranja smo ponovili še dvakrat in sprani kulturi dodali 1 ml sterilne morske vode.

3.7.1.2 Potek poskusa

Za poskus smo uporabili plošče za celične kulture z 12 vdolbinicami. V 3 vdolbinice (tri ponovitve) smo dodali 3 ml sterilne morske vode in vanje vstavili po 1 košček ostrige s 5 polipi, ki smo jim pripisali oznako bP (polipi, ki smo jim v poskusu dodali bakterije). Ena vdolbinica na plošči je služila kontroli (oznaka bP_K), vanjo smo pred eksperimentom vstavili 5 mrtvih posušenih polipov. V tako pripravljene vzorce smo dodali po 1 ml ^3H označene sprane bakterijske kulture. Inkubirali smo 7,5 ur pri temperaturi 24°C .

Po inkubaciji smo polipe s pomočjo secirne igle in Pasteurjeve pipete odstranili z ostrige in jih prenesli na filtre z 1 μm velikimi porami. Polipe smo sprali s sterilno morsko vodo (2x filtrirana na 0,2 μm). Da bi odstranili ^3H označene bakterije s površine polipov, smo filtre s polipi trikrat sprali s 100% triklorocetno kislino, nato trikrat s 5 % triklorocetno kislino in trikrat s 70 % etanolom. Filtru s polipi smo dodali 10 ml scintilacijske mešanice (Ultima Gold) in merili radioaktivnost s tekočinskim scintilacijskim števcem. Rezultate smo podali v enotah dpm (ang. disintegration per minute). Izmerili smo tudi radioaktivnost praznega filtra (negativna kontrola (K_0)).

Poleg polipov, smo merili radioaktivne impulze v vzorcih morske vode z dodano označeno bakterijsko kulturo pred (t_0) in po inkubaciji (t_{end} , v dvojniku). Po odvzemu smo

1 ml vzorca dodali 50 μ l 100% trikloroacetne kisline, da smo preprečili morebitne dodatne reakcije. Vse vzorce smo nato centrifugirali 15 minut pri 16.000 obratih na minuto pri 4 °C. Aspirirali smo supernatant, dodali 1,5 ml 5% TCA in mešali na vorteks mešalniku. Znova smo centrifugirali vzorce, aspirirali supernatant in dodali 1,5 ml 70% etanola. Postopek smo ponovili in vzorcem dodali 1,5 ml scintilacijske mešanice. Nato smo merili radioaktivnost s tekočinskim scintilacijskim števcem in dobili podatke v dpm enotah.

Rezultate smo pripravili s programom Microsoft Excel 2013 in so podani v tabelah. Začetne vrednosti dodanih s tritijem označenih bakterij (t_0), smo podali kot 100%, vrednosti po koncu poskusa (t_{end}) pa kot delež radioaktivnosti glede na začetno vrednost v posamezni ponovitvi. Radioaktivnost, ki smo jo zaznali v vzorcih s polipi je prav tako podana kot delež radioaktivnosti glede na začetno vrednost dodanih bakterij..

3.7.2 Izvedba drugega poskusa z radioaktivnim označevanjem

3.7.2.1 Priprava kulture naravne populacije bakterij iz morske vode označene s ^3H

Morsko vodo iz katere smo pripravili mikrobovno kulturo smo vzorčili na merilni postaji BF5 (Boja Vida) v Piranskem zalivu na globini 5 metrov. V laboratoriju smo 80 ml morske vode prefiltrirali skozi filter s porami velikimi 3 μ m. V erlenmajerici smo filtrat zmešali z 80 mg kvasnega ekstrakta in 240 μ l ^3H označenega levcina. Tako pripravljeno kulturo smo inkubirali na stresalniku, s stresanjem 200 obratov na minuto, pri sobni temperaturi 18,5 ur. Nato smo kulturo razdelili v krioepruvice po 2 ml in sprali nevezan ^3H levcin. To smo naredili tako, da smo vzorce centrifugirali 10 minut pri 16.000 obratih na minuto pri 4 °C, supernatant aspirirali in peletu dodali 1 ml sterilne morske vode. Sledilo je mešanje na vorteks mešalniku. Postopek spiranja smo ponovili še dvakrat in sprani kulturi dodali 2 ml sterilne morske vode. Vzeli smo podvzorec K_1 , kjer kulture nismo filtrirali ter podvzorec F_1 , kjer smo kulturo filtrirali na filtru z 1 μ m velikimi porami. Poleg tega smo vzorčili 2 ml nefiltrirane kulture (K_1) in filtrirane kulture (F_1) za štetje bakterij. Na ta način smo preverili zanesljivost filtracije, ki smo jo uporabili v nadaljnjih postopkih.

3.7.2.2 Priprava polipov, efir in ceponožcev

Polipe smo odstranili z ostrig in jih po 5 prenesli na ploščo s 6 vdolbinicami. Pustili smo jih 6 dni, da so se pritrdili na podlago ter pri tem vsak dan menjavali vodo. V tem času jih nismo hranili. Izvedli smo 5 ponovitev ali 5 vdolbinic, ki smo jim pripisali oznako bP. Ena vdolbinica na plošči je služila kontroli (oznaka bP_K), vanjo smo pred eksperimentom vstavili 5 mrtvih polipov (zamrznjeni so bili na -20 °C). V vsako vdolbinico smo pred začetkom poskusa dodali 9 ml sterilne morske vode (Slika 4).

Efire smo stradali 3 dni pred poskusom in jih po 3 vstavili v vdolbinice na plošči. Izvedli smo 5 ponovitev ali 5 vdolbinic, ki smo jim pripisali oznako bE (efire, ki smo jim v poskusu dodali bakterije). Ena vdolbinica na vsaki plošči je služila kontroli (oznaka

bE_K), vanjo smo pred eksperimentom vstavili 3 mrtve efire (zamrznjene so bile na -20°C) (Slika 4). V vsako vdolbinico smo pred začetkom poskusa dodali 9 ml sterilne morske vode.

Rake ceponožce (Crustacea: Copepoda) smo en dan pred poskusom zajeli s planktonsko mrežico s porami velikosti $200\text{ }\mu\text{m}$ na vzorčevalni postaji pri oceanografski boji Vida. Do eksperimenta smo jih vzdrževali pri temperaturi 15°C in prezračevanju. Iz zooplanktonskega vzorca smo nato na dan poskusa pod stereolupo s pomočjo pipete odbrali ceponožce iz redov *Calanoida*, *Cyclopoida* in *Harpacticoida* v velikosti med $300\text{--}500\text{ }\mu\text{m}$. V enem primeru smo v vdolbinice na plošči s 6 vdolbinicami dodali 15 osebkov, v drugem primeru pa 9 osebkov. V obeh primerih smo izvedli po 3 ponovitve. Vdolbinicam s ceponožci smo pripisali oznako bC15 (15 ceponožcev, ki smo jim v poskusu dodali bakterije) in bC9 (9 ceponožcev, ki smo jim v poskusu dodali bakterije) (Slika 4).

3.7.2.3 Potek poskusa

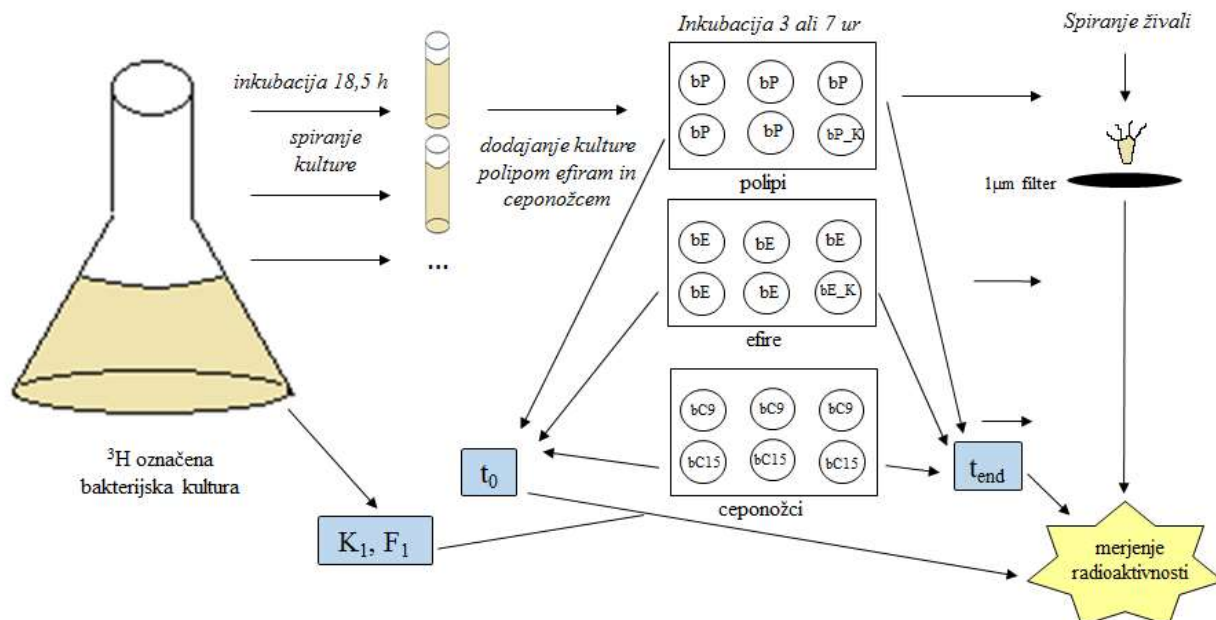
Polipom, efiram in ceponožcem v vdolbinicah smo dodali po 2 ml s ^3H označene sprane bakterijske kulture. Pred inkubacijo smo iz vsake vdolbinice vzeli podvzorce morske vode z dodano označeno bakterijsko kulturo (0,5 ml ali 1 ml) in jih označili s t_0 . Nato smo mešanico v vdolbinicah rahlo pomešali in inkubirali: ceponožce 3 ure ter polipe in efire 7 ur pri 15°C v temi.

Po koncu inkubacije smo polipe, efire in ceponožce prenesli na filtre z $1\text{ }\mu\text{m}$ velikimi porami ter jih trikrat sprali s sterilno morsko vodo, trikrat s 5% TCA, trikrat s 70 % etanolom ter nazadnje s sterilno morsko vodo. Filtru s polipi smo dodali 10 ml scintilacijske mešanice (Ultima Gold) in merili radioaktivnost v enotah dpm s tekočinskim scintilacijskim števcem. Poleg tega smo tudi po koncu inkubacije vzeli 1 ml vzorce morske vode z dodano označeno bakterijsko kulturo za merjenje s scintilacijskim števcem (t_{end}) in še 2 ml vzorce za štetje bakterij.

Vzorcem bakterijske kulture ali morske vode z dodanimi bakterijami, ki smo jih vzorčili pred in po inkubaciji (K_1 , F_1 , t_0 , t_{end}) smo dodali 100 % triklorocetno kislino (TCA), tako da je bilo razmerje vzorec: TCA 1: 20 (5 % raztopina). Nato smo jih pripravili po enakem postopku kot je opisano v prejšnjem poskusu (poglavje 3.6.1.2) ter izmerili število radioaktivnih impulzov s tekočinskim scintilacijskim števcem. Na ta način smo dobili rezultate v dpm enotah.

Podatke smo nato preračunali na število impulzov (dpm) na volumsko enoto (dpm/ ml), kjer je bilo to potrebno. Rezultate smo pripravili s programom Microsoft Excel 2013 in so podani v tabelah. Začetne vrednosti dodanih s tritijem označenih bakterij (t_0), smo podali kot 100%, vrednosti po koncu poskusa (t_{end}) pa kot delež radioaktivnosti glede na začetno

vrednost v posamezni ponovitvi. Radioaktivnost, ki smo jo zaznali v vzorcih z živalmi je prav tako podana kot delež radioaktivnosti glede na začetno vrednost dodanih bakterij.



Slika 4: Shema metode drugega poskusa z radioaktivno označenimi bakterijami. Uporabljene oznake so pojasnjene v besedilu.

3.7.3 Materiali uporabljeni v prvem in drugem poskusu

- gojišče ZoBell 2216E s sestavo:

pepton (Sigma –Aldrich, ZDA)	2,5	g
kvasni ekstrakt (Sigma- Aldrich, ZDA)	0,5	g
agar (Merck KGaA, Nemčija)	7,5	g
filtrirana morska voda	375	ml
destilirana voda	125	ml,
- GF/F filtri iz steklenih mikrovlaknen (Whatman, ZK),
- filter s $3\text{ }\mu\text{m}$ velikimi porami (Merck Millipore, ZDA),
- Millex GS filter s $0,22\text{ }\mu\text{m}$ porami (Merck Millipore, ZDA),
- filter z $1\text{ }\mu\text{m}$ velikimi porami (Nucleopore, Whatman, ZK),
- plošča za celične kulture z 12 vdolbinicami (Costar®, Corning Inc., ZDA),
- plošče za celične kulture s 6 vdolbinicami (Costar®, Corning Inc., ZDA),
- secirna igla,
- Pasteurjeve pipete,
- pipete in nastavki za pipete,
- erlenmajerica,
- Petrijeve plošče,
- kriotubice (Sarstedt, Nemčija),
- izotop levцина - ^3H –Leu (Perkin Elmer, ZDA),
- triklorocetna kislina - TCA (Sigma - Aldrich, ZDA),

- 70% etanol (Sigma - Aldrich, ZDA),
- scintilacijska mešanica (Ultima Gold XR, Perkin Elmer, ZDA),
- scintilacijski števec (Tri-Carb 3100TR, Perkin Elmer, ZDA),
- stereolupa (SZX 16, Olympus, Japonska),
- spektrofotometer (UV/VIS Lambda 14, Perkin Elmer, ZDA),
- centrifuga (5417R, Eppendorf, Nemčija),
- vorteks mešalnik (MS2 Minishaker, IKA, Nemčija),
- stresalnik (KS 501 digital, IKA, Nemčija),
- sistem za filtracijo z membransko črpalko (Merck Millipore, ZDA).

3.7.4 Določanje števila bakterij z mikroskopiranjem

Za štetje bakterij smo izbrali eno izmed ponovitev vsake obravnave (bP, bP_K, bE, bE_K, bC15 in bC9) ter kontroli (K₁ in F₁). Število bakterij smo določali z epifluorescentnim mikroskopom po metodi Porter in Feig (1980).

3.7.4.1 Priprava vzorcev za štetje bakterij

Vzorci, ki smo jih pripravili za štetje bakterij smo najprej fiksirali z dodatkom filtriranega formaldehida (0,22 µm) v razmerju 1 : 20 (5% raztopina formaldehida). Sterilno morsko vodo za razredčitve smo pripravili tako, da smo jo dvakrat filtrirali na filtru z 0,22 µm velikimi porami. Vzorce smo obdelali z ultrazvokom in dobro premešali na vorteks mešalniku, da smo razbili morebitne skupke bakterij. Vzorcem bakterijske kulture K₁ in F₁ smo dodali sterilno morsko vodo, tako da smo dobili enako razmerje kot v poskusu in sicer 9:2 (sterilna morska voda: bakterijska kultura). Drugih vzorcev t_{end} nismo redčili.

Pripravili smo sistem za filtracijo z membransko črpalko ter nanj položili filter z 0,2 µm velikimi porami. Čez smo pritrdili steklen tulec in vanj odpipetirali 0,5 ml posameznega vzorca. Filter smo pred barvanjem dobro osušili. Na objektno stekelce smo kanili kapljico DAPI barvila in nanj položili filter. Nanj smo kanili še eno kapljico barvila ter preparat pokrili s krovnim stekelcem. Tako pripravljene preparate smo pustili 15 minut v temi, da se je barvilo vezalo na DNK.

Uporabljeni materiali:

- formaldehid (Sigma-Aldrich, ZDA),
- barvilo DAPI (ProLong® Gold antifade reagent with DAPI, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- Millex GS filter s 0,22 µm porami (Merck Millipore, ZDA),
- GTBP črni filtri z 0,2 µm velikimi porami (Isopore™ membrane, Merck Millipore, ZDA),
- GF/F filtri iz steklenih mikrovlačen (Whatman, ZK),
- pipeta in nastavki za pipeto,

- objektna in krovna stekelca,
- vorteks mešalnik (MS2 Minishaker, IKA, Nemčija),
- sistem za filtracijo z membransko črpalko (Merck Millipore, ZDA),
- ultrazvočni procesor (Vibra-Cell, Sonics & Materials, ZDA).

3.7.4.2 Mikroskopija in štetje bakterij

Vsak filter smo pregledali pod epifluorescentnim mikroskopom BX51 (Olympus, Japonska) in posneli 19 vidnih polj pod 1000x povečavo s kamero XC10 (Olympus, Japonska) in z uporabo programa cellSens Standard (Olympus, Japonska). Slike smo nato prešteli s programom CellC (Selinummi in sod., Tampere University of Technology, Finska). Število celic na liter smo izračunali po enačbi (1), rezultate pa obdelali v programu Microsoft Excel 2013. Za ugotavljanje povezave med številom dodanih bakterij na začetku poskusa (K_1) in številom bakterij po koncu poskusa pri različnih obravnavah (bP, bP_K, bE, bE_K, bC15, bC9) smo uporabili statistični test ANOVA in t-test. Za statistično značilne razlike smo izbrali tiste p-vrednosti, ki so bile manjše od 0,05 ($p < 0,05$).

$$\frac{\text{število celic}}{L} = \frac{P_{\text{filter}} \times N_{\text{povprečno}}}{P_{\text{vidno polje}} \times V} \quad (1)$$

4 REZULTATI

4.1 INDUKCIJA STROBILACIJE POLIPOV



Slika 5: Različni razvojni stadiji uhatega klobučnjaka.

Strobilacijo lahko pri polipih uhatega klobučnjaka sproži sprememba temperature. V našem primeru smo temperaturo vode znižali za 9 °C (iz 24 °C na 15 °C) in s kamero spremljali in posneli strobilacijo polipov na eni ostrigi ter sproščanje efir (sliki 5 in 6). Po treh tednih smo v akvariju opazili prve efire. V raziskavi Malej in sodelavci (2012) poročajo, da so v Luki Koper zasledili od 6 do 27 polipov/cm², pri čemer so polipi večinoma pritrjeni na lupinah ostrig na stebrih pomolov. Strobilacija tu poteka med marcem in oktobrom. Pri strobilaciji se lahko iz enega polipa sprosti tudi do 18 efir.



Slika 6: Spremljanje strobilacije polipov pritrjenih na lupino ostrige; A - polipi 10. dan po znižanju temperature; B - polipi 18. dan po znižanju temperature (Foto: T. Makovec).

4.2 HISTOLOŠKA ZGRADBA POLIPOV UHATEGA KLOBUČNJAKA (*Aurelia aurita* s. l.)

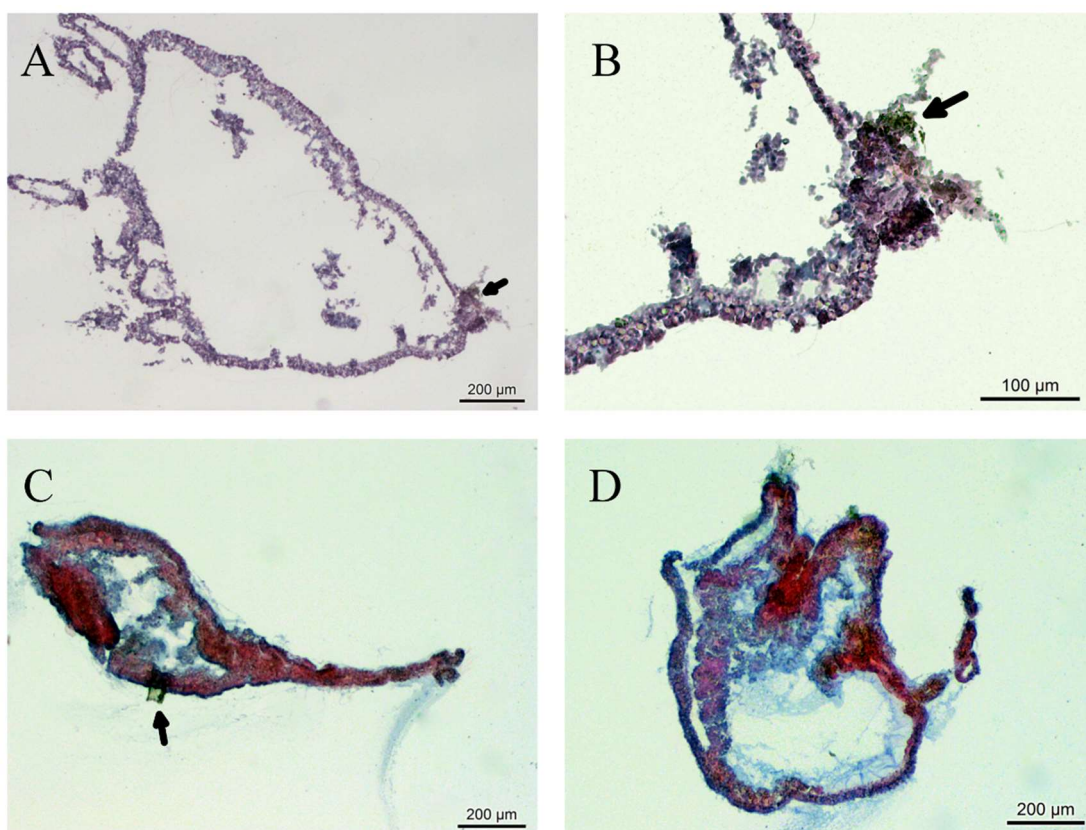
Z uporabo različnih mikroskopskih tehnik in metod barvanja in različnih smo preučili telesno zgradbo polipov uhatega klobučnjaka, predvsem količino sluzi na ektodermu in gastrodermu polipov ter morebitno prisotnost pritrjenih ali nepritrjenih bakterij na površini polipov.

Preglednica 2: Tehnike barvanja, ki smo jih uporabili pri delu.

tehnika	hematoksilin-eozin (HE)		Alcian modro (AB) + nuclear fast red ali Gillov hematoksilin		postopek PAS + DAPI	
	komponente	komponente	komponente	komponente	komponente	komponente
	hematoksilin	eozin	nuclear fast red ali Gillov hematoksilin	Alcian modro	DAPI	PAS
barvane spojine	organske fosfatne skupine v jedru	organske kationske strukture	spojine v jedru	kisli mukopolisaharidi in mucini	DNK	nevtralni mucini in drugi glikoproteini
rezultat	modro vijolična do modra jedra	rožnata citoplazma	rdeča ali vijolična jedra	modra sluz in mukusne celice	modra fluorescenca jeder	rožnato rdeča sluz in druge strukture

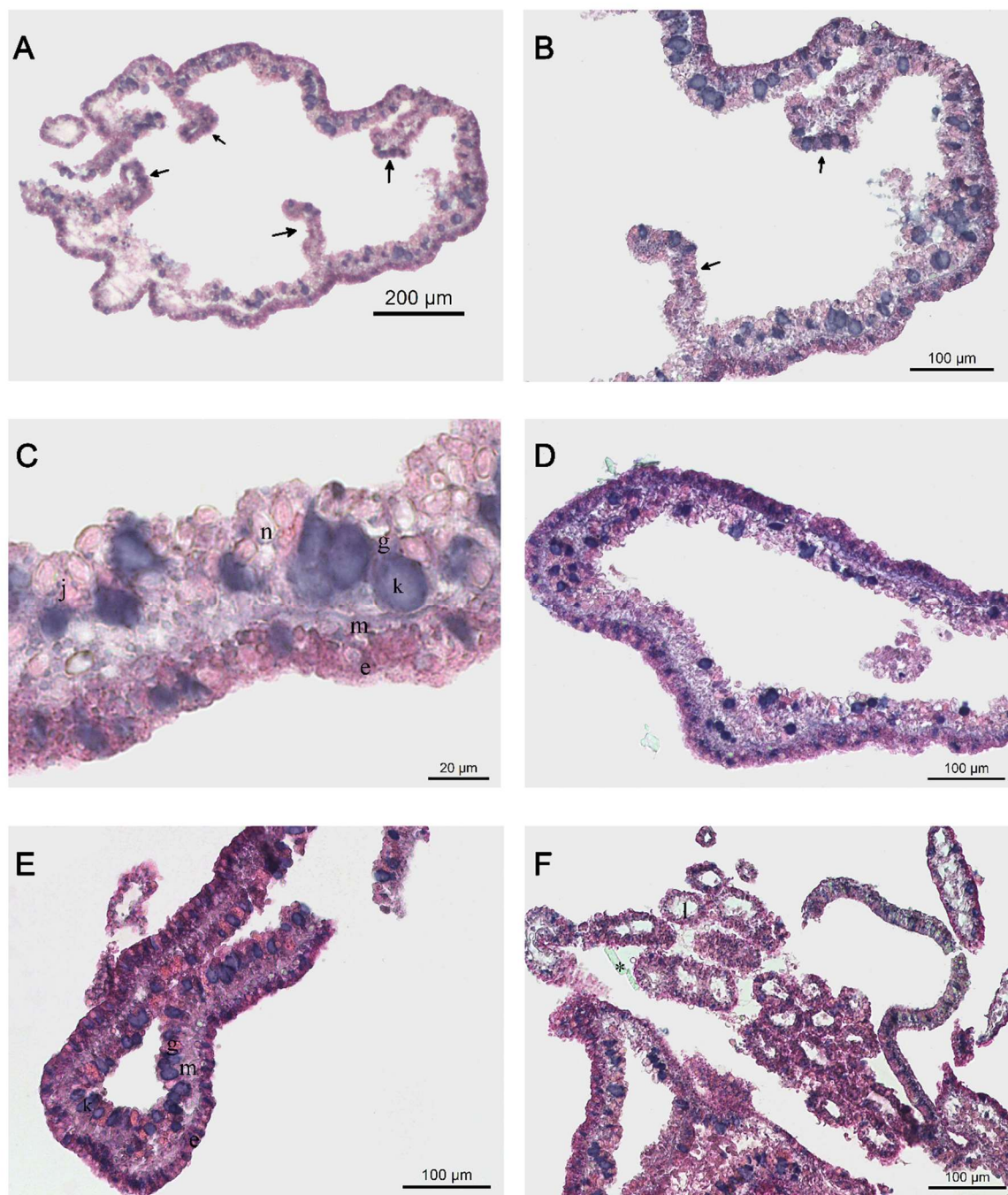
4.2.1 Histološka zgradba polipov po barvanju s hematoksilinom in eozinom (HE)

Pri barvanju s hematoksilinom in eozinom se organske fosfatne spojine v jedrih obarvajo vijolično, organski kationski proteini v citoplazmi pa rožnato (Parracho in Morais, 2015). Na preparatih lahko opazujemo telesno steno iz treh celičnih plasti, ki so značilne za ožigalkarje. Telesna stena polipov je iz ektoderma, gastroderma, kjer dobro vidimo jedra in iz vmesne mezogleje s proteinskimi vlakni (slika 8C, D, E). Pri preparatih s prečnim prerezom lahko opazujemo štiri septe, ki segajo v notranjost gastralne votline (slika 8A, B). Pri preparatih z vzdolžnim prerezom (sliki 7A, B) vidimo predel pedalnega diska, na katerem lahko pogosto opazimo algam podobne strukture, ki so najverjetneje prisotne na podlagi na katero se polip pritrdi. Poleg pedalnega diska te strukture lahko opazimo tudi na drugih delih telesa (slika 7C).



Slika 7: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko zamrzovanja (fiksaciji 1 in 2) in barvani s hematoksilinom in eozinom (HE). A in C – vzdolžni prerez polipa; B – pedalni disk. S puščico so označene algam podobne strukture.

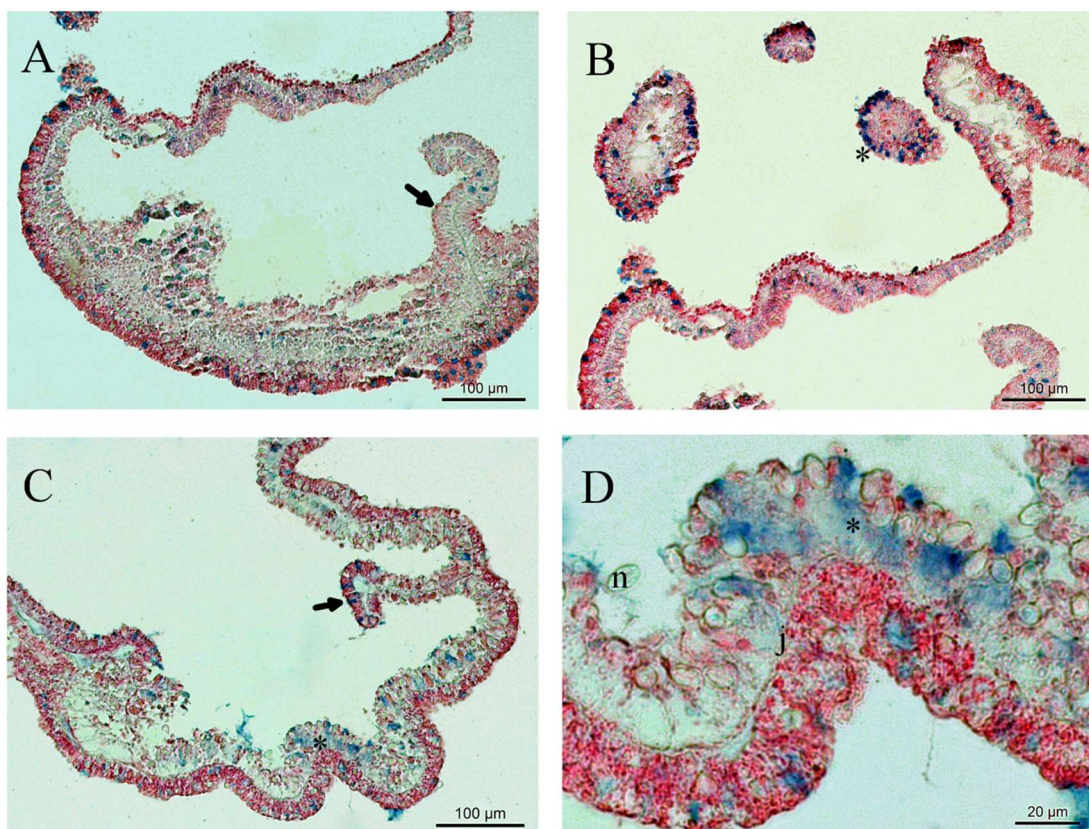
Pri nekaterih vzorcih smo prečno prerezali tudi lovke, ki na prvi pogled izgledajo, kot bi bile votle (slika 8F). Znano pa je, da lovke klobučnjaških polipov niso votle, temveč so v sredici celice, medtem, ko so pri meduzah lovke lahko votle ali polne (Arai, 1997). Na vseh preparatih so dobro vidne nematociste (označene na sliki 8C). Pri barvanju smo opazili večje predele v obliki kapelj hematoksilina, velikih med 10 µm in 20 µm. Dobro se jih vidi na parafinskih rezinah, predvsem na predelu gastroderma, manjše in manj izrazite kaplje lahko opazimo tudi v ektodermu.



Slika 8: Histološki preparati polipov, pripravljenih s tehniko parafinskih rezin (fiksacija 3) in barvani s hematoksilinom in eozinom (HE). Oznake: s puščicami so označene septe, e – ektoderm, m – mezogleja, g – gastroderm, n– nematocista, j– jedro, l– lovka, k– kaplja hematoksilina * - algam podobne strukture.

4.2.2 Histološka zgradba polipov po barvanju z Alcian modrim (AB)

Pri barvanju z Alcian modrim (AB) se modro obarvajo makromolekule, ki vsebujejo karboksilne ali sulfatne skupine. S to tehniko smo preverjali prisotnost kislih mucinov in mukopolisharidov (Parracho in Morais, 2015). V kombinaciji z AB smo uporabili barvila, ki obarvajo celično jedro, v večini primerov nuclear fast red, na drugih preparatih pa Gillov hematoksilin. Tako pri tehniki s parafinom, kot tudi pri obeh tehnikah z zamrzovanjem je prišlo do modrega obarvanja določenih delov preparatov. Iz literaturnih podatkov je znano, da barvilo obarva klobučnjaške mucine (Pearson in sod., 2011).



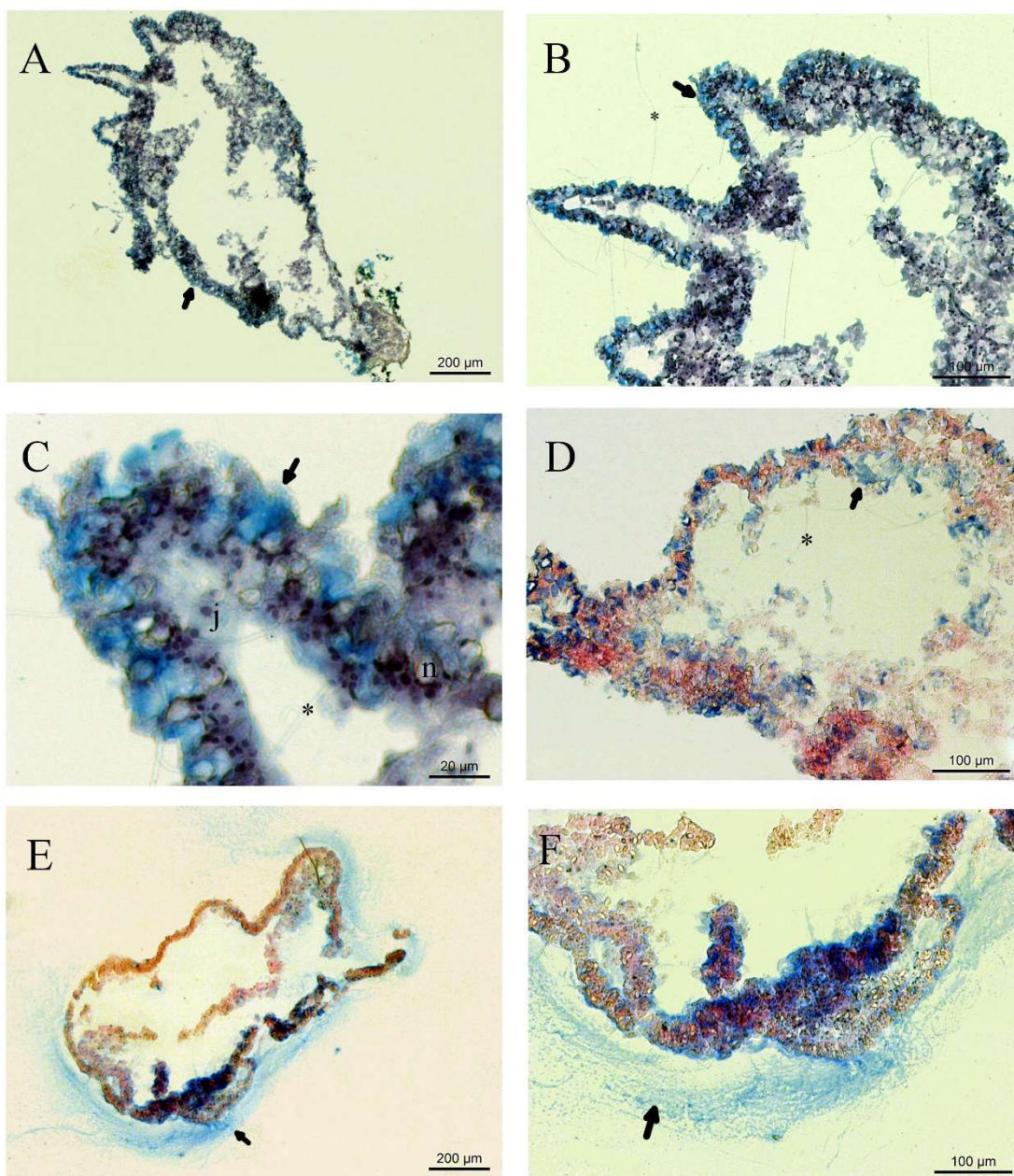
Slika 9: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko parafinskih rezin (fiksacija 3) in barvani s Alcian modrim in nuclear fast red. Oznake: z * so označeni deli, ki so močno obarvani z Alcian modrim, s puščico so označene septe, n – nematocista, j – jedro.

Na preparatih, pripravljenih s tehniko parafinskih rezin lahko opazimo, da so intenzivno modro obarvani predvsem deli ektoderma, svetlejše modro pa mezogleja. Sklepamo lahko, da so intenzivno modre strukture v ektodermu mukusne celice, ki vsebujejo veliko sluzastega izločka. Mukusne celice so namreč pogoste v integumentu klobučnjaških polipov (Goldberg, 2002).

Pri tehniki z vkapljanjem v parafin pred barvanjem odstranjujemo parafin iz preparata s pomočjo ksilena s čimer lahko odstranimo tudi izločene mucine in lipide. Zato tehnike z vkapljanjem v parafin niso primerne za dokazovanje zgoraj omenjenih snovi v tkivu in smo za te namene uporabili tehniki z zamrzovanjem. Tkivo v takem primeru obdrži

naravno stanje in je hidrirana sluz boljše ohranjena (Cohen in sod., 2012). Pri nekaterih zamrznjenih vzorcih lahko opazimo tudi sprožene nematociste (slika 10B, C in D).

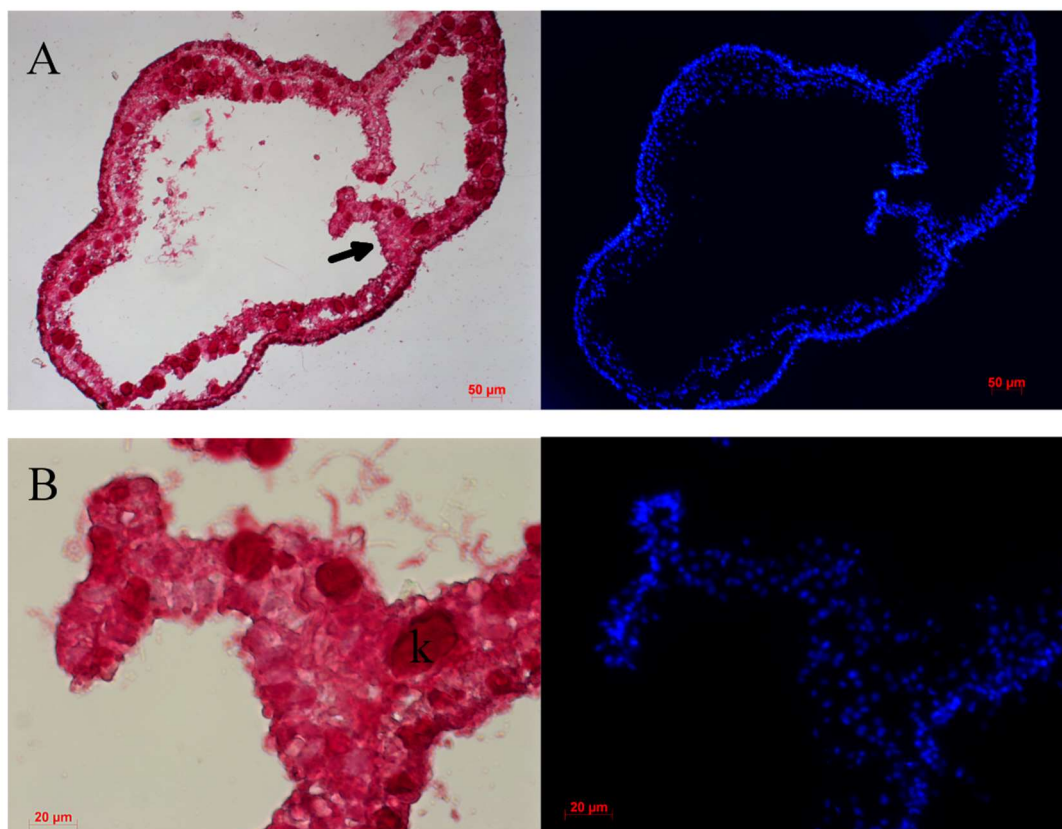
Pri zamrznjenih vzorcih je prišlo do reakcije z barvilom AB na večjem delu preparata v primerjavi s parafinskimi preparati, predvsem na površini ektoderma. Podoben plašč sluzi so na histoloških preparatih opazili tudi pri drugih ožigalkarjih (Frank in Bleakney, 1976).



Slika 10: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko zamrzovanja (fiksaciji 1 in 2) in barvani s Alcian modrim in Gillovim hematoksilinom (A, B in C) ali nuclear fast red (D, E in F). Oznake: s puščicami so označeni deli večjih koncentracij sluzi, n – nematocista, j – jedro, * - sprožena nematocista.

4.2.3 Histološka zgradba polipov po barvanju s postopkom PAS

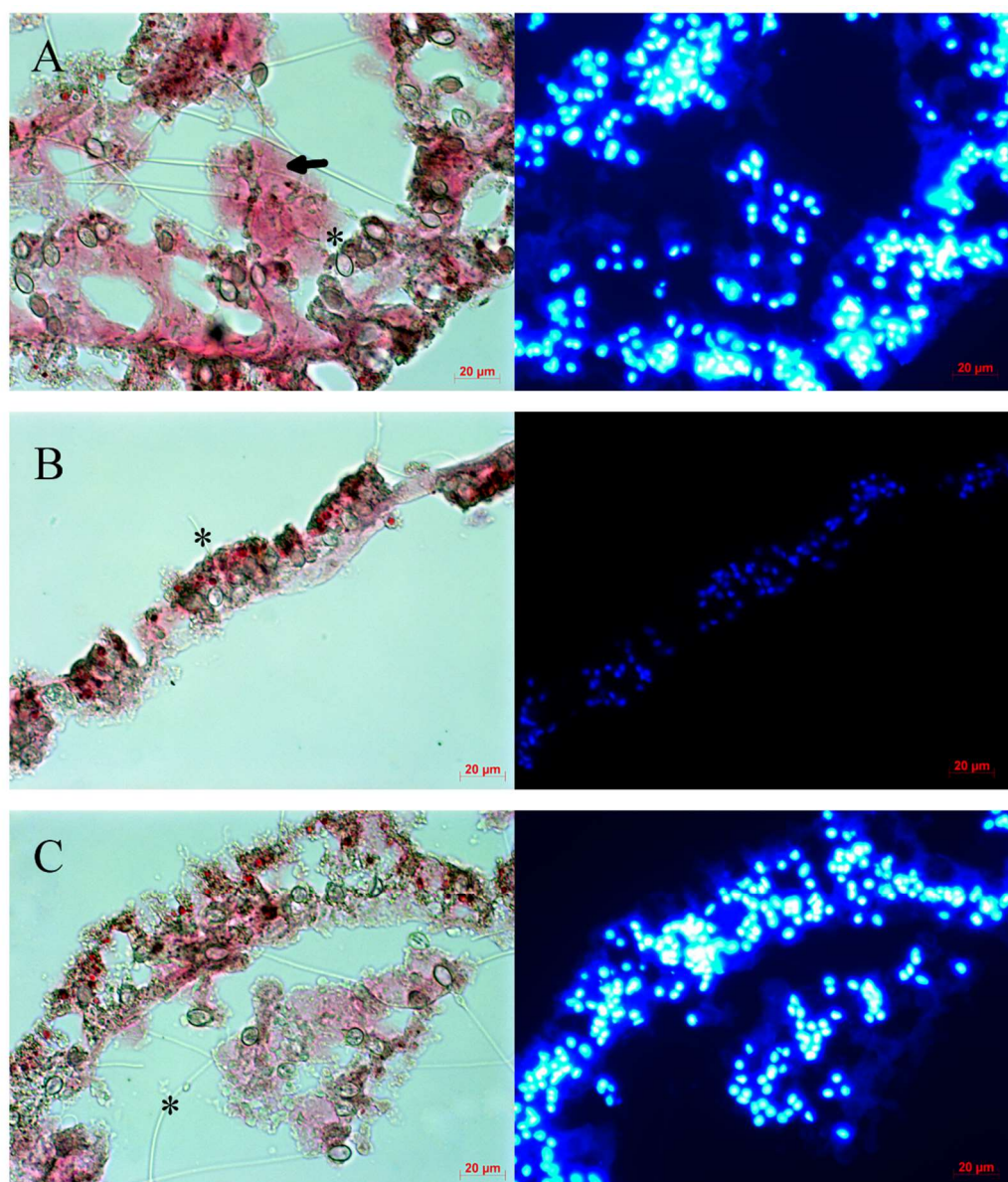
S postopkom barvanj PAS smo preverjali prisotnost nevtralnih ogljikovih hidratov, kot so glikoproteini, lipoproteini in mucini, ki so prisotni v sluzastih izločkih in se obarvajo rožnato rdeče (Bancroft in Gamble, 2008). V kombinaciji s PAS smo uporabili fluorescentno barvilo DAPI, ki se veže na DNK, zato se jedra obarvajo modro. Slike pri tem barvanju so posnete pri dveh različnih vzbujevalno-zapornih filterih.



Slika 11: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko parafinskih rezin (fiksacija 3) in barvani po postopku s PAS in DAPI. Slike na levi sta posnete pri vidni svetlobi, desni slike pa z UV filtrom za DAPI. Oznake: s puščico je označena septa, k- kaplja barvila.

Pri vseh tehnikah lahko opazimo, da se je rožnato rdeče obarval celoten preparat, kljub temu lahko vidimo določene dele, ki so obarvani bolj intenzivno. Tudi mezogleja je bila PAS pozitivna, kar je značilno za ožigalkarje, najverjetneje vsebuje mukoproteine ali glikoproteine (Frank in Bleakney, 1976).

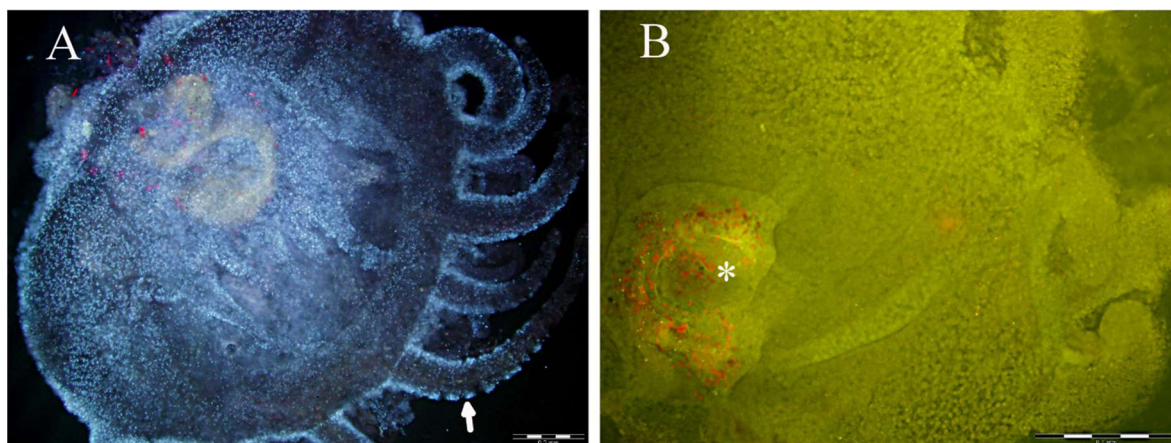
Pri parafinskih preparatih se je tkivo obarvalo najbolj intenzivno (slika 11), opazimo lahko kaplje barvila na določenih delih, kar smo opazili tudi pri HE barvanju. Tudi pri barvanju s postopkom PAS so kaplje premera 10 µm do 20 µm, opazimo jih na gastrodermu in ektodermu. Na preparatih lahko opazujemo tudi sprožene nematociste (slika 12).



Slika 12: Histološki preparati polipov, pripravljeni s tehniko zamrzovanja (fiksaciji 1 in 2) in barvani po postopku PAS in DAPI. Slike na levi sta posneti pri vidni svetlobi, desni slike pa z UV filtrom nastavljenim za DAPI. Oznake: s puščico je označen primer pozitivne PAS reakcije, z * so označene sprožene nematociste.

4.2.4 Zgradba celih polipov po barvanju z DAPI

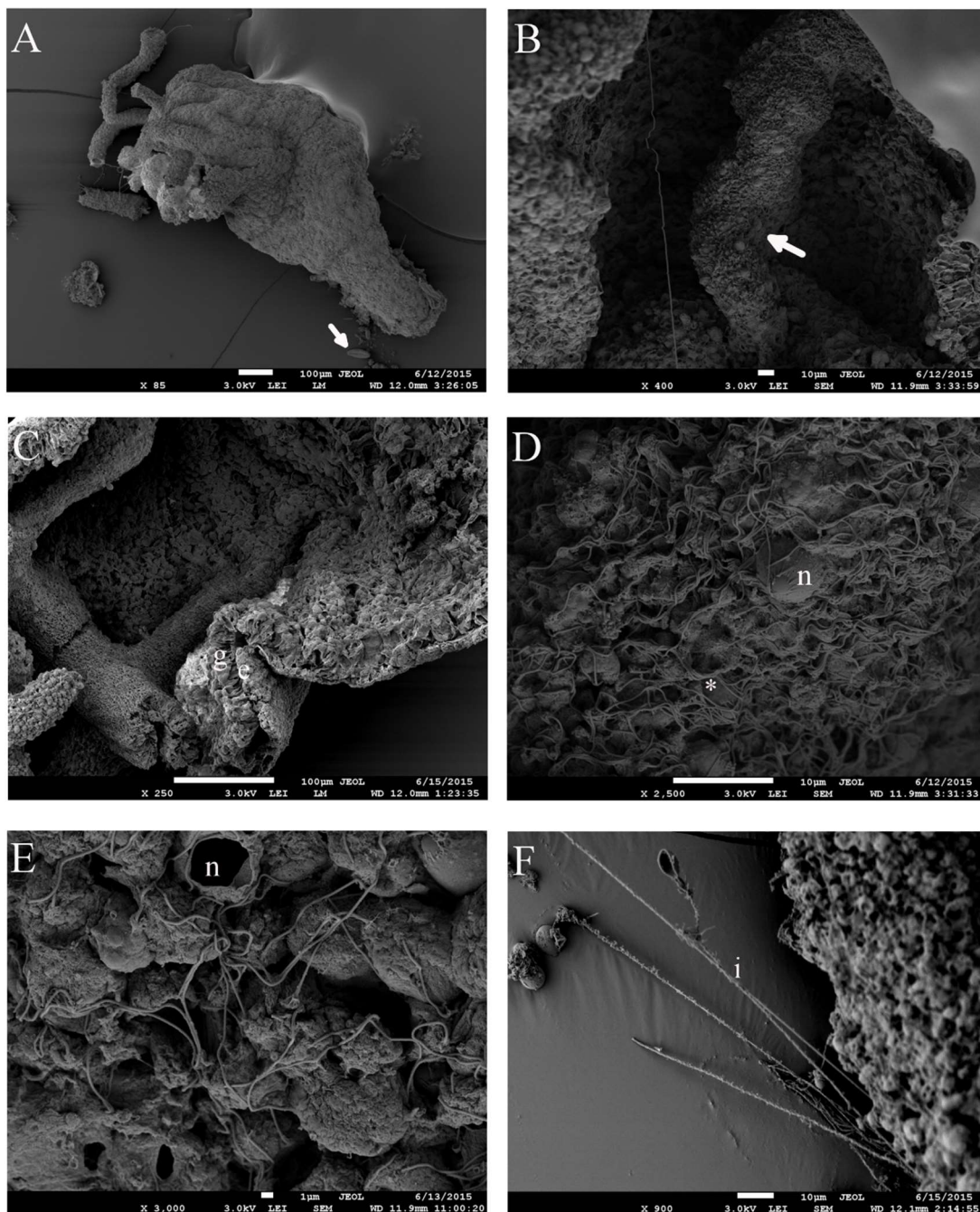
Na sliki 13 vidimo cel (13A) in prepolovljen polip (13B), ki ju nismo fiksirali in rezali, temveč smo jih cele položili med objektnik in krovník ter barvali z DAPI. Jedra na sliki 13A fluorescirajo modro. Na sliki 13C pa vidimo enako pripravljen polip, le v valovni dolžini modro zelene svetlobe. Na tej sliki lepo vidimo organizme, ki vsebujejo klorofil (rdeča fluorescenca) in so zgoščeni na pedalnem disku polipa.



Slika 13: Preparati celih polipov barvanih z DAPI. Slika A je slikana z UV filtrom nastavljenim za DAPI, slika B pa z modro zelenim filtrom. Oznake: s puščico je označena lovka, z * je označen pedalni disk.

4.3 STRUKTURA POVRŠINE POLIPOV POSNETA Z VRSTIČNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO (SEM)

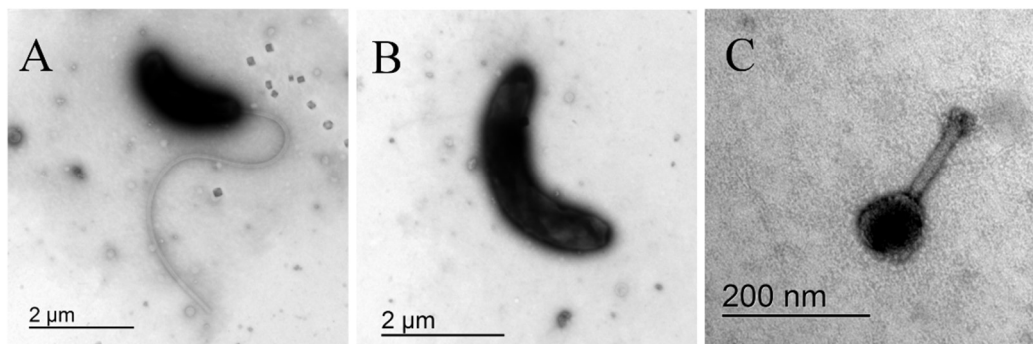
Raznolikost površine polipa uhatega klobučnjaka se jasno vidi pri velikih povečavah vrstične elektronske mikroskopije (slika 14). Opazovali smo zunanjo površino in gastralno votlino. Ob pedalnem disku (puščica na sliki 14A) lahko opazimo kremenasti algi podobno strukturo. Prečni prerez stene polipa in notranjost polipa, oz. njegovo gastralno votlino z eno od 4 sept, ki pregrajujejo gastralno votlino prikazuje slika 14B in 14C. Površina gastralne votline je prekrita z migetalkami in skupki mukusa na površini (slika 14D) ter številnimi nematocistami z operkulumom pred in po sprožitvi (slike 14D, E in F). Mikroorganizmov na površini preparatov polipa nismo opazili.



Slika 14: Površina polipov posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Oznake: s puščico je označena A-kremenasti algi podobna struktura B-septa, g – gastroderm, e – ektoderm, n – nematocista, * - cilije, i – sprožene nematociste.

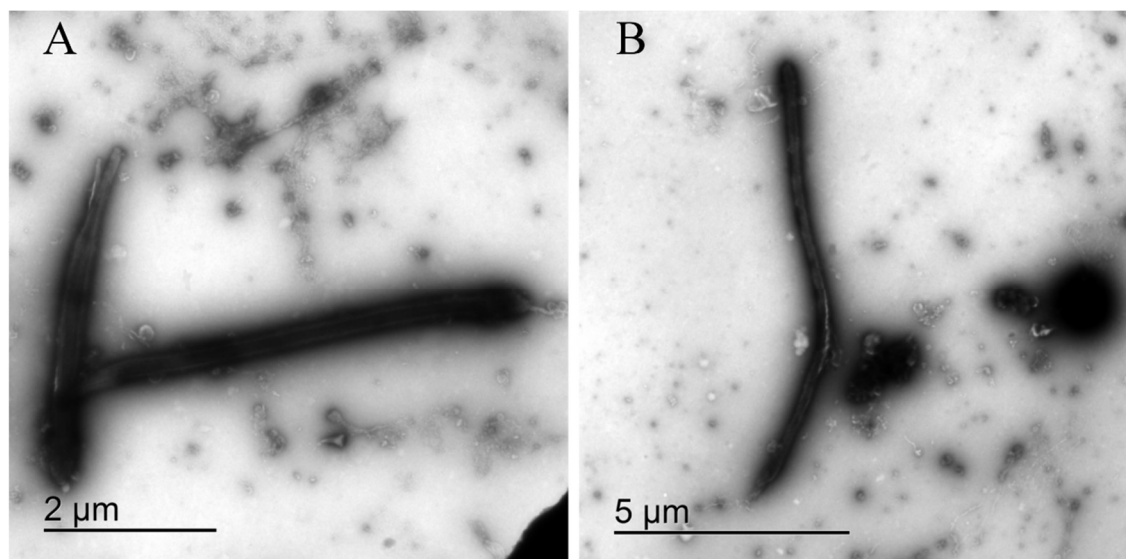
4.4 SLUZ POLIPA POSNETA S PRESEVNO ELEKTRONSKO MIKROSKOPIJO (TEM)

S tehniko negativnega kontrasta na presevnem elektronskem mikroskopu smo želeli ugotoviti ali so na površini ali v postrgani sluzi gastralne votline polipov uhatga klobučnjaka prisotne bakterije. V maceratu vzorca polipa smo opazili nekaj različnih tipov bakterij in bakteriofaga (slika 15 A, B, C).



Slika 15: Macerat polipa, negativni kontrast (TEM). A in B - paličasti bakteriji, C - fag z vidno glavo in vratom.

Pri ogledu dveh preparatov, pripravljenih z različnima tehnikama (strganjem po površini gastralne votline, in maceracijo) smo opazili veliko močno kontrastnih paličastih struktur, dolžine 3 – 15 µm (slika 16). Samo iz oblike in velikosti ne moremo ugotoviti ali so to bakterije.



Slika 16: Paličaste strukture iz vzorca brisa gastralne votline, negativni kontrast (TEM).

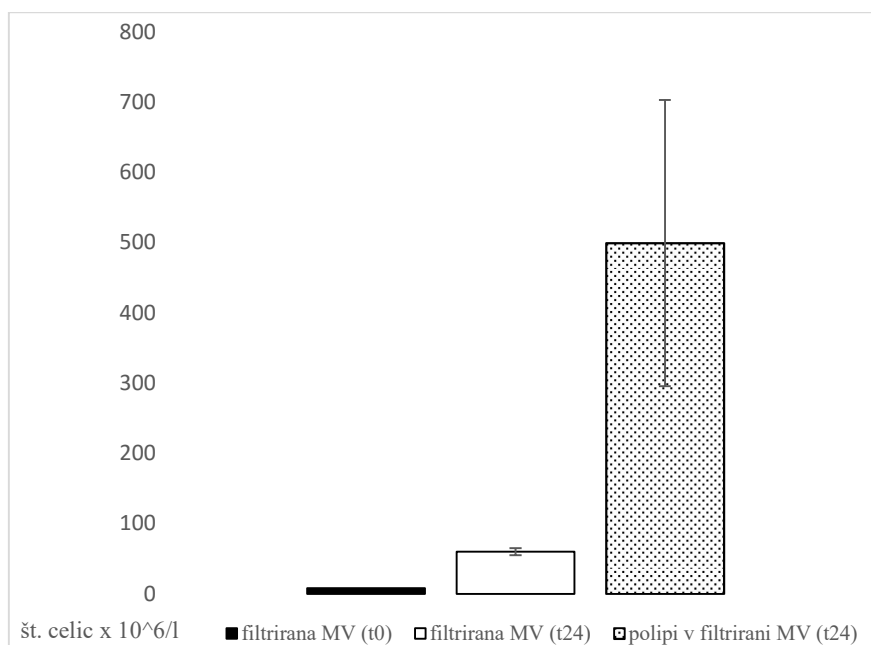
4.5 VPLIV POLIPOV IN EFIR NA PREHRANSKE SPLETE IN BAKTERIJSKO POPULACIJO

Heterotrofni del mikrobne prehranjevalne zanke vključuje več trofičnih nivojev, ki povezujejo mikrobe z višjimi nivoji prehranske verige in kroženjem ogljika, dušika in drugih elementov. Klobučnjaki s hranjenjem, iztrebljanjem in produkcijo sluzi sproščajo DOM in anorganska hranila v okolje. Organska snov vpliva na metabolizem in rast bakterij in s tem na prenos ogljika in energije na višje trofične nivoje v mikrobni zanki in prehranskem spletu.

4.5.1 Vpliv polipov na naravno populacijo bakterij

S poskusom smo želeli preveriti vpliv metabolitov polipov na rast heterotrofnih bakterij v morski vodi. Morsko vodo (MV) smo filtrirali skozi GF/F filtre, da smo odstranili vse organizme večje od 0,8 μm , razen bakterij. Inkubacija je trajala 24 ur, kontrolni poskus smo izvedli z morsko vodo brez polipov. Število bakterij smo določili v vzorcu MV pred in po inkubaciji v treh ponovitvah. Rezultati so podani kot število bakterij na liter MV, v primeru vode s polipi je to število bakterij na liter morske vode na 10 polipov.

Rezultati poskusa (slika 17) kažejo, da se število bakterij v morski vodi, kamor smo dodali polipe uhatega klobučnjaka po 24 urah močno poveča, v povprečju kar 62-krat. Pri kontroli, kjer vodi nismo dodali polipov in smo le inkubirali 24 ur na sobni temperaturi pa se število bakterij poveča 8-krat.



Slika 17: Število bakterij (v milijonih/l) v filtrirani morski vodi z in brez polipov po 24 urah inkubacije. Oznake: MV – morska voda, t₀ – na začetku inkubacije, t₂₄ – po 24 urah inkubacije. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost ± standardna napaka.

4.5.2 Poskusi z radioaktivno označenimi bakterijami

V dveh poskusih smo poskušali oceniti ali so lahko morske bakterije vir hrane za višje organizme in trofične povezave med organizmi različnih velikostnih razredov. Prenos organske snovi in vira energije na višje nivoje smo testirali z metodo privzema s ^3H označenih bakterij v organizme kot so polipi in efire uhatega klobučnjaka ter raki ceponožci (Malej in sod., 2006).

V prvem poskusu smo pripravili kulturo bakterijskega izolata *Halomonas* sp., ki je bila izolirana iz morske vode Piranskega zaliva, v drugem pa celokupno populacijo bakterij vzorca morske vode. Bakterijsko kulturo smo inkubirali s ^3H levcinom. Ko smo dosegli dovolj visoko biomaso/število bakterij, smo kulturo sprali in kulturo označenih bakterij dodali ločeno polipom, efiram uhatega klobučnjaka in ceponožcem. Pred in po inkubaciji smo v vzorcih morske vode in v organizmih merili število radioaktivnih impulzov in število bakterij v okoljni vodi.

V prvem poskusu smo v vdolbinice dali po pet polipov, ki so bili pritrjeni na ostrige. V drugem poskusu je bilo v vsaki vdolbinici po pet polipov, v vdolbinicah z efirami pa so bile po tri efire v vsaki. Za razliko v številu smo se odločili zaradi tega, ker efira potrebuje več prostora za premikanje in prehranjevanje. Ceponožci so po velikosti manjši od polipov in efir, zato smo se pri njih odločili za 15 ali 9 osebkov na vdolbinico.

Rezultati merjenja radioaktivnosti v vzorcih so podani v preglednicah 3-6. Začetne vrednosti dodanih s tritijem označenih bakterij (t_0), smo podali kot 100%, vrednosti po koncu poskusa (t_{end}) pa kot delež radioaktivnosti glede na začetno vrednost v posamezni ponovitvi. Radioaktivnost, ki smo jo zaznali v vzorcih z živalmi je prav tako podana kot delež radioaktivnosti glede na začetno vrednost dodanih bakterij. Rezultati v enotah dpm in dpm/ml so v prilogah A-D.

4.5.2.1 Prvi poskus

Rezultati prvega poskusa kažejo, da se radioaktivnost označenih bakterij v vodi pred in po koncu inkubacije s polipi ni spremenila (pregl. 3). V vzorcih s polipi smo zaznali le 3% začetne vrednosti dodanih označenih bakterij. Rezultati kontrole pa kažejo zmanjšanje radioaktivnosti v vodi po koncu inkubacije, vrednost v vzorcu z mrtvimi polipi na koncu inkubacije je bila le 1%. V tem poskusu so bile tri ponovitve ($n = 3$). Pri kontroli je bila ena ponovitev ($n = 1$), polipi pa so bili usmrčeni s sušenjem na zraku.

Preglednica 3: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) v prvem poskusu. Oznake obravnav: bP-polipi, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bP_K-kontrola: mrtvi polipi, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bP		bP_K	
	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v polipih (%)	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v polipih (%)
t_0	100 ± 30	/	100	/
t_{end}	100 ± 27	3 ± 1	86	1

4.5.2.2 Drugi poskus

Rezultati drugega poskusa kažejo, da se je pri poskusu s polipi (pregl. 4) radioaktivnost označenih bakterij v vodi zmanjšala glede na začetno, pri kontroli pa je ostala približno enaka. Izmerjena vrednost v vzorcih s polipi po koncu eksperimenta je bila približno enaka tako pri živih polipih kot tudi pri mrtvih v kontroli. Pri efirah smo opazili podoben vzorec (pregl. 5). Radioaktivnost označenih bakterij se je v vodi zmanjšala po koncu inkubacije, pri kontroli pa ostala približno enaka. V efirah smo zaznali le nekaj odstotkov dodane radioaktivnosti. V tem poskusu je bilo pet ponovitev ($n = 5$). Pri kontroli je bila ena ponovitev ($n = 1$), polipi in efire pa so bili usmrčeni z zamrzovanjem na -20°C .

Preglednica 4: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) pri polipih v drugem poskusu. Oznake obravnav: bP-polipi, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bP_K- kontrola: mrtvi polipi, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bP		bP_K	
	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v polipih (%)	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v polipih (%)
t_0	100 ± 8	/	100	/
t_{end}	84 ± 3	4 ± 1	101	5

Preglednica 5: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) pri efirah. Oznake obravnav: bE-efire, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bE_K- kontrola: mrtve efire, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bE		bE_K	
	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v efirah (%)	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v efirah (%)
t_0	100 ± 7	/	100	/
t_{end}	83 ± 10	3 ± 1	99	7

Preglednica 6: Delež radioaktivnosti, ki smo jo izmerili po inkubaciji (t_{end}) glede na začetno dodano vrednost (t_0) pri ceponožcih. Oznake obravnav: bC15 - 15 ceponožcev, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bC9- 9 ceponožcev, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bC15		bC9	
	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v ceponožcih (%)	^3H bakterije (%)	^3H bakterije v ceponožcih (%)
t_0	100 ± 21	/	100 ± 5	/
t_{end}	93 ± 8	13 ± 3	87 ± 7	25 ± 7

Pri ceponožcih (pregl. 6) se je v primeru, ko je bilo osebkov 15, radioaktivnost označenih bakterij v vodi nekoliko zmanjšala, vendar manj kot ko smo imeli v poskusu le 9 živali. Radioaktivnost v vzorcih s ceponožci po koncu poskusa pa je bila večja kot v efirah in polipih. Pri poskusu z devetimi ceponožci kar 25 %. V poskusu s ceponožci kontrole z mrtvimi živalmi ni bilo, imeli smo po tri ponovitve ($n = 3$).

Pred in po inkubaciji živali z bakterijami smo vzeli vzorce za štetje bakterij. Vzorce smo obarvali s fluorescentnim barvilom DAPI, ki se veže na DNK v celicah. Obarvane bakterije smo nato prešteli pod epifluorescentnim mikroskopom. Rezultati štetja bakterij v vzorcih različnih obravnav so podani v preglednici 7. Število heterotrofnih bakterij v naših vzorcih je bilo med $1,23 \times 10^{10}/\text{l}$ in $5,67 \times 10^{10}/\text{l}$.

Število bakterij v kulturi pred inkubacijo se ne razlikuje bistveno od števila bakterij iste kulture, ki smo jo filtrirali skozi filter z $1 \mu\text{m}$ velikimi porami. Predvidevamo, da so radioaktivno označene bakterije prehajale filter. Torej smo pri spiranju živali po koncu inkubacije skozi filter sprali vse nepritrjene bakterije in se te niso zadržale na filtru. Po inkubaciji smo v vseh obravnavah s polipi, efirami in ceponožci ugotovili manjše število bakterij kot pred inkubacijo. Statistično značilne razlike smo zaznali med številom bakterij na liter v bakterijski kulturi pred inkubacijo (K_1) in v primeru dodajanja označenih bakterij mrtvim polipom (bP_K), ter v bakterijski kulturi pred inkubacijo (K_1) in v primeru dodajanja označenih bakterij devetim ceponožcem (bC9).

Preglednica 7: Število bakterij pred in po inkubaciji v drugem poskusu z radioaktivno označenimi bakterijami. Oznake: K₁ – radioaktivno označena kultura, redčena na enako koncentracijo kot je bila po koncu inkubacije, F₁ - K₁, filtrirana na filtru s porami 1 µm, bP – voda v obravnavi s polipi, ki smo jim dodali ³H označene bakterije, bP_K- kontrola; voda v obravnavi z mrtvi polipi, ki smo jim dodali označene bakterije, bE – voda v obravnavi z efirami, ki smo jim dodali ³H označene bakterije, bE_K- kontrola; voda v obravnavi z mrtvimi efirami, ki smo jim dodali označene bakterije, bC15 - voda v obravnavi s 15 ceponožci ki smo jim dodali ³H označene bakterije, bC9- voda v obravnavi z 9 ceponožci, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečno število celic na liter $\times 10^{10} \pm$ standardna napaka.

	pred inkubacijo		po inkubaciji					
	K ₁	F ₁	bP	bP_K	bE	bE_K	bC15	bC9
št. celic/l $\times 10^{10}$	$5,67 \pm 1,17$	$4,67 \pm 0,81$	$3,11 \pm 0,55$	$1,23 \pm 0,25^*$	$2,96 \pm 0,64$	$3,19 \pm 0,57$	$3,34 \pm 0,51$	$1,92 \pm 0,39^*$

Z * so označene statistično značilne razlike v primerjavi s K₁ ($p < 0,05$).

5 RAZPRAVA

Bakterije in zooplankton predstavljajo pomembno komponento v pelaški prehranski verigi in v procesih kroženja hranil (Tang in sod., 2010). Tudi želatinozni zooplankton predstavlja organsko bogata mikrookolja, ki vplivajo na hitrost rasti bakterij, njihovo abundanco in vrstno sestavo na organizmih kot tudi v okoljni vodi. V zadnjih desetletjih je masovno pojavljanje vrste klobučnjaških meduz *Aurelia aurita* s.l. v Slovenskem morju prostorsko obsežno in pogosto (Kogovšek in sod., 2010). Meduze imajo malo naravnih plenilcev, zato njihovo odmrlo tkivo predstavlja organsko bogat substrat, ki spodbudi hitro rast in spremeni sestavo bakterijske združbe. Rezultati analiz sekvenc bakterijske združbe v času razpada meduz kažejo na spremembe od alfa proteobakterij do gama proteobakterij in flavobakterij, ter prevlado bakterij iz družin Pseudoalteromonadaceae in Vibrionaceae (Tinta in sod. 2010; 2012). Rezultati trofičnih povezav želatinoznega planktona, manjših plenilcev in mikroorganizmov, kažejo na kaskadni učinek želatinoznega planktona na mikrobno avtotrofno in heterotrofno populacijo (Turk in sod. 2008).

V prvem delu naloge smo s pomočjo različnih mikroskopskih in barvnih tehnik raziskali zgradbo polipov, poskušali smo določiti prisotnost bakterij na površini in v sluzi polipov uhatega klobučnjaka ter oceniti prisotnost sluzi v polipih. V drugem delu naloge smo želeli preveriti še vpliv polipov in efir na prehranske spletne in bakterijsko populacijo. Zanimalo nas je ali lahko polipi uhatega klobučnjaka s svojimi izločki vplivajo na rast bakterij ter kako vplivajo na posamezne mikroorganizme v prehranski verigi, predvsem v odnosu do bakterij.

5.1 MIKROSKOPSKE RAZISKAVE UHATEGA KLOBUČNJAKA

5.1.1 Histološka zgradba polipov

Pri pregledovanju histoloških preparatov polipov smo lahko opazovali značilno zgradbo telesne stene ožigalkarjev, ki je iz gastroderma, mezogleje in ektoderma. Na prečno prerezanem preparatu smo videli štiri septe, ki pregrajujejo gastralno votlino polipov. Pri vseh tehnikah preparacije in barvanja so bile dobro vidne nematociste in celična jedra. Histokemijski reakciji z AB in PAS nakazujeta na to, da vsebuje telesna stena polipov uhatega klobučnjaka kisle in nevtralne mucine oz. mukopolisaharide in glikoproteine. Ugotavljamo, da polipi uhatega klobučnjaka izločajo sluz. Pri tehnikama barvanja s HE in PAS smo na preparatih parafinskih rezin opazili kaplje barvila, s premerom med 10 µm in 20 µm. Največ jih je bilo mogoče opaziti na predelu gastroderma. Podobne strukture so opazovali pri drugih ožigalkarjih in glede na reakcije z različnimi histološkimi barvili sklepali, da gre za mukusne žleze z izločki (Frank in Bleakney, 1976). Glede na velikost bi to lahko bili tudi skupki mukoznih celic. V primeru barvanja z AB na preparatih nismo videli povsem enakih struktur v obliki kapelj kot pri drugih dveh barvanjih, modro obarvani predeli v gastrodermu in ektodermu namreč niso bili tako homogeni in pravilnih

oblik. Sklepamo, da so se na preparatih obarvale tako mukusne celice, kot tudi sama sluz. Glede na rezultate postopka PAS in barvanja z AB ugotavljamo, da so nevtralni in kisli mucini oz. mukopolisaharidi in glikoproteini prisotni tako na notranji kot tudi na zunanji strani telesne stene polipov. Pri meduzah sluz nastaja v celicah v ektodermu (Heeger in Möller, 1987) in gastrodermu (Arai, 1997), kar smo potrdili tudi z našimi rezultati.

Pri interpretaciji rezultatov in primerjavi različnih preparativnih tehnik smo imeli težave zaradi različnih debelin preparatov. Tehnike, ki smo jih uporabili so namreč zahtevale uporabo tako debelih rezin, da so se dobro rezale in se niso trgale. V debelejših rezinah se ujame več barvila kot tanjših, kar se odraža v raznolikem obarvanju vzorcev.

5.1.2 Vloga biofilma pedalnega diska

Kot smo opazili z različnimi preparativnimi tehnikami, pedalni disk polipov uhatega klobučnjaka naseljujejo mikroorganizmi, ki vsebujejo klorofil, najverjetneje alge. Polipi se pritrjujejo na različne podlage, ki so dom različnih sesilnih organizmov (Miyake in sod., 2002). Iz prejšnjih raziskav vemo, da imajo različne vrste klobučnjaških ličink preferenco do nekaterih vrst podlage, morda tudi zaradi strukture samih biofilmov, ki se oblikujejo na teh podlagah (Holst in Jarms, 2007). Podobno kot polip uhatega klobučnjaka tudi zelena hidra naseljuje podlage z biofilmi. Kot odgovor na to ima epitelij v predelu noge štirikrat višjo sposobnost inhibicije bakterijske rasti (Kasahara in Bosch, 2003).

5.1.3 Podrobna zgradba polipov uhatega klobučnjaka (SEM, TEM)

Z metodo SEM smo pregledovali površine polipa z velikimi povečavami. Površina gastralne votline in ektoderma je prekrita s cilijami in skupki sluzi. Veliko je intaktnih in sproženih nematocist. Glede na dosedanje raziskave (Colwell in Liston, 1962, cit. po Doores in Cook, 1976; Weiland-Bräuer in sod., 2015) je mikrobiota uhatega klobučnjaka zelo pestra. Bakterije namreč velikokrat naseljujejo predele nevretenčarjev, kjer se sprošča velika količina hranil (Carman in Dobbs, 1997, Möller in sod., 2003). Kljub številnim podatkom o prisotnosti velikega števila različnih bakterij na površinah meduz, v našem primeru na površini in v gastralni volini polipa nismo opazili bakterij, kar omenjajo tudi nekateri raziskovalci (Johnston in Rohwer, 2007). Opazili smo le kremenasti algi podobno strukturo na predelu pedalnega diska. Kljub našim ugotovitvam ne moremo povsem izključiti možnosti, da so bakterije na površini vseeno prisotne. V prihodnje bi bilo treba optimizirati postopek priprave vzorcev in pregledati večje število vzorcev.

Prisotnost paličastih bakterij, različnih neprepoznavnih struktur in celo bakteriofaga smo potrdili pri pregledu vzorca maceriranega polipa po metodi negativnega kontrasta s TEM mikroskopijo. Nekateri predhodni raziskave mikrobiote polipov uhatega klobučnjaka, so pokazale, da so filamentozne paličaste bakterije prevladujoči mikroorganizmi, ki so jih z metodo sekvenciranja tarčnega odseka 16S rRNA gena zaznali na polipih (Weiland-Bräuer in sod., 2015). Ob pregledovanju literature smo našli opisane podobne strukture kot smo

jih v velikem številu videli na naših preparatih. Te prikazujejo filamentozne bakterije, ki jih najdemo v morskih okoljih in so dolge med 3 in 66 μm (Yu in sod., 2013). Strukture na naših mikrografijah so dolge med 3 in 15 μm . Vendar naše mikrografije niso dovolj, da bi potrdili, da so prisotne strukture bakterije. Za potrditev, bi bile potrebne nadaljnje analize. Obstaja tudi možnost, da strukture izvirajo iz telesa polipov, morda sproženih nematocist.

Razlogov za nizko število bakterij v vzorcih je več, lahko da v naših vzorcih bakterije niso bile prisotne v večjem številu ali je bila neprimerna priprava vzorca. Možno je namreč, da morske bakterije pri preparaciji niso vzdržale osmotskega šoka. Glede na to, da postopka nismo ponavljali, ne moremo oceniti napake postopka ali kolikšen delež bakterij je lahko na površini ali v gastralni votlini polipa.

Kot že omenjeno, imajo polipi uhatega klobučnjaka precej različno ekološko in predvsem prehransko vlogo v primerjavi z efirami in meduzami, zato je nemogoče o mikrobioti in prisotnosti bakterij na površini govoriti le z vidika organizma, preiskave pa bi bilo treba ponoviti na vseh stadijih živali. Sesilni organizmi imajo namreč precej drugačne tehnike plenjenja in izbire plena kot planktonski, razlike so zato možne tudi pri odnosu z bakterijami in drugimi mikroorganizmi. Z našim delom smo ugotovili, da je sluz prisotna na zunanji telesni površini polipa in tudi na površini gastralne votline, vendar pa s histološkimi tehnikami in vrstično elektronsko mikroskopijo bakterij nismo opazili. S tehniko negativnega kontrasta na TEM smo opazili nekaj bakterij, vendar njihovega izvora in vloge ne moremo razložiti. V prihodnjih raziskavah bi lahko poskusili z metodo FISH zaznati nekatere bakterije, ki so jih že odkrili na polipih in efirah s sekvenciranjem tarčnega odseka 16S rRNA gena. Nadaljevali bi lahko z optimizacijo metod elektronske mikroskopije, morda poskusili tudi s SEM zamrznjenih-hidriranih vzorcev.

5.2 VPLIV POLIPOV IN EFIR NA PREHRANSKE SPLETE IN BAKTERIJSKO POPULACIJO

Rezultati merjenja števila bakterij v morski vodi kažejo, da se število bakterij v prisotnosti polipov uhatega klobučnjaka v primerjavi s kontrolo precej poveča. Že v preteklih raziskavah so dokazali, da obstaja posredna trofična povezava med heterotrofnimi bakterijami in meduzami tako, da se bakterijska in fitoplanktonska biomasa in bakterijska produkcija povečata v prisotnosti meduze uhatega klobučnjaka (Turk in sod., 2008). Avtorji predvidevajo, da je to posledica zmanjšane plenilskega pritiska bakteriovorov in/ali zaradi sproščanja raztopljenih organskih snovi s strani meduz. Tudi na primeru efir so pokazali, da se v prisotnosti teh organizmov število in biomasa heterotrofnih prokariotov poveča (Zoccarato in sod., 2016). Raziskave Condon in sodelavcev (2011) kažejo, da DOM, ki ga sproščajo meduze naravna bakterijska populacija razgradi v večji meri (52% do 86%) že po šestih do osmih urah. Na podlagi tega sklepamo, da je razlog za povečanje števila bakterij v našem poskusu prisotnost organske snovi, ki jo lahko bakterije uporabijo za rast. Tekom magistrske naloge nam ni uspelo izmeriti raztopljenih organskih snovi

(DOM) v vodi v prisotnosti polipov in efir uhatega klobučnjaka, vendar bi bil to zanimiv poskus za v prihodnje.

S poskusi z radioaktivno označenimi bakterijami smo želeli preveriti ali polipi in efire uhatega klobučnjaka privzemajo bakterije, saj so okrog organizmov v morski vodi prisotne številne bakterije. Že samo opažanje, da imajo polipi večinoma ustno odprtino dalj časa odprto, nas je usmerilo na misel, da z morsko vodo v gastralno votlino vstopajo tudi bakterije. Vemo, da lahko nekateri morski nevretenčarji z vodo zanesene bakterije uporabijo kot vir prehrane (Harris, 1993). Koralnjaki s hranjenjem z bakterioplanktonom pridobijo mnogo potrebnih hranil, kot so fosfor, železo in vitamini (Sorokin, 1973). Želeli smo preveriti ali je tako tudi pri polipih in efirah uhatih klobučnjakov. Polipi imajo občutljiv sistem za detekcijo hranil v vodi. Ugotovili so, da naravno prisotne kemikalije kot so organske kisline, urea, nekatere maščobne kisline in lipidi ter mnogo aminokislin in peptidi, pri polipih sprožijo prehranski refleks, ki vključuje zvijanje lovka, zevanje ust in vpoteg lovka v usta (Loeb in Blanquet, 1973; Arai, 1997). Spraševali smo se ali se morda podobno dogaja z bakterijami.

Omejili smo se le na privzem bakterij, ne pa tudi na samo asimilacijo bakterijske biomase v telo živali. V poskusih smo uporabili metodo privzema ^3H označenih bakterij v organizme po Malej in sodelavci (2006). Podobno metodo so uporabili že na bentoških organizmih (Pascal in sod., 2008) in praživalih (Zubkov in Sleight, 1995).

O hranjenju ceponožcev z bakterijami je bilo narejenih kar nekaj raziskav (Malej in sod., 2006, Cnudde in sod., 2013) in vemo, da v določenih primerih ceponožci privzemajo bakterije. Zato smo v drugem poskusu poleg inkubacije bakterij z uhatim klobučnjakom, izvedli tudi inkubacijo bakterij s ceponožci, da bi lažje ovrednotili rezultate ter potrdili dosedanje raziskave. Ker so ceponožci eden glavnih virov prehrane polipov in efir uhatega klobučnjaka (Arai, 1997), smo želeli z dodatnim poskusom preveriti posredni prenos bakterij v višji trofični nivo. Radioaktivno označene bakterije smo inkubirali s ceponožci, te pa smo po koncu inkubacije dodali polipom in efiram. Med inkubacijo, ki je trajala tri ure, ni prišlo do hranjenja polipov in efir s ceponožci, zato rezultatov poskusa nismo predstavili. Pri takem poskusu bi bila potrebna dodatna optimizacija poskusa, lahko bi uporabili večji volumen vode v katerem so se nahajale živali.

Pred razlaganjem rezultatov je treba poudariti, da merjenje radioaktivnosti v vzorcih z nizko radioaktivnostjo ni natančna metoda. Prav tako lahko sistem hitro kontaminiramo. Rezultati prvega poskusa ne kažejo nikakršnega zmanjšanja v radioaktivnosti v vodi po zaključku poskusa v primerjavi z začetno vrednostjo. Ker tudi v polipih nismo zaznali skoraj nobene radioaktivnosti, smo predvidevali, da v poskusu ni prišlo do hranjenja polipov z bakterijami oz. vnosa označenih bakterij v gastralno votlino polipov. Obratno pa je pri kontroli prišlo do zmanjšanja radioaktivnosti v vodi po koncu inkubacije, v polipih pa smo izmerili zanemarljivo nizko radioaktivnost. Pri poskusu smo opazili veliko standardno deviacijo. Predvidevamo, da zato ker razmere pri vseh ponovitvah niso bili

povsem primerljive. Polipi so bili tu še pritrjeni na ostrige in jih je bilo po koncu inkubacije treba odstraniti z ostrig, kar je še dodatna možnost kontaminacije vzorcev. Tudi zaradi majhnega števila ponovitev, smo se odločili poskus ponoviti in optimizirati.

V drugem poskusu smo poleg polipov testirali tudi efire, saj so nas zanimale razlike v hranjenju pri obeh stadijih. Planktonske efire imajo namreč drugačen način predacije kot sesilni polipi. Povečali smo število ponovitev ($n = 5$) in bakterijsko kulturo *Halomonas* sp. zamenjali s celokupno bakterijsko populacijo vzorca morske vode. Za to smo se odločili, da bi se bolj približali razmeram v morju. V tem primeru se je radioaktivnost v vodi zmanjšala v primerjavi z začetkom tako pri polipih kot tudi pri efirah. Pri kontroli pa se radioaktivnost skozi čas ni spreminjala. Na podlagi tega sklepamo, da so polipi in efire privzele del označenih bakterij. V samih osebkih nismo v nobenem primeru zaznali večjega deleža radioaktivnosti, le ta je na nivoju sevanja okolja.

Tudi v poskusu s ceponožci je prišlo do zmanjšanja radioaktivnosti v vodi v primerjavi z začetkom. Na koncu je v ceponožcih ostalo več radioaktivnosti v primerjavi s polipi in efirami. Malej in sodelavci (2006) ugotavljajo, da lahko manjši ceponožci zaužijejo bakterije v skupkih. Tudi v našem drugem poskusu so bile bakterije, kljub procesiranju z ultrazvokom, v skupkih, kar smo lahko videli pri štetju bakterij pod epifluorescentnim mikroskopom. Zaradi tega je bilo tudi štetje bakterij oteženo. Glede na naše rezultate in podatke iz literature sklepamo, da manjši ceponožci lahko privzemajo bakterije, vendar verjetno le kadar je koncentracija visoka in so te v skupkih.

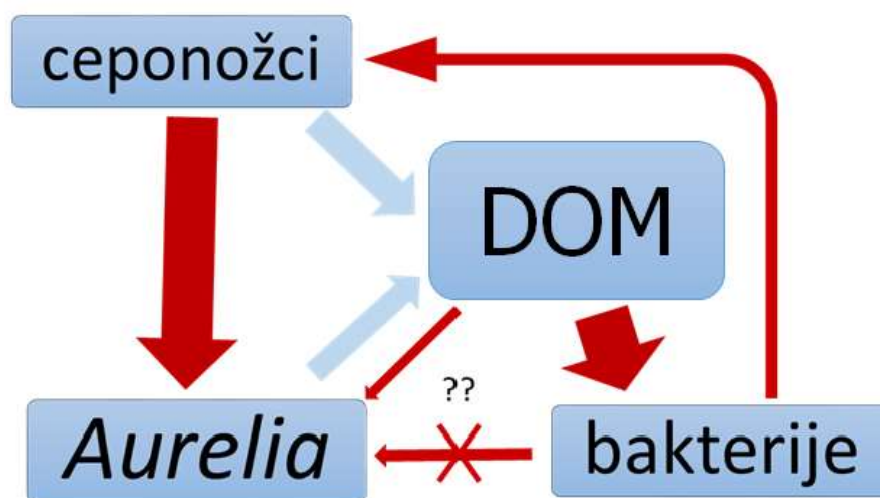
Število heterotrofnih bakterij v naših vzorcih je bilo med $1,23 \times 10^{10}/l$ in $5,67 \times 10^{10}/l$, kar je nekoliko višje kot dolgoletna povprečja števila bakterij v morju Piranskega zaliva. Rezultati štetja bakterij kažejo zmanjšanje števila bakterij na liter morske vode po koncu inkubacije v vseh obravnavah s polipi, efirami in ceponožci. Največje, statistično značilno zmanjšanje števila smo ugotovili pri inkubaciji z devetimi ceponožci. To se sklada z merjenjem radioaktivnosti v vzorcih, razen pri kontrolah, kjer je štetje bakterij pokazalo zmanjšanje števila po koncu inkubacije, medtem ko se radioaktivnost skozi čas ni spremenila. To lahko poskušamo pojasniti s tem, da pri štetju bakterij nismo jemali vzorcev, vzeti direktno iz vsake poskusne vdolbinice pred začetkom poskusa, temveč smo vzeli le en vzorec (K_1), vzet pred dodatkom kulture živalim. Pri dodajanju kulture v različne vdolbinice je lahko prišlo do razlik v številu dodanih bakterij, saj so se kot zgoraj omenjeno, bakterije pojavljale v skupkih. Razlog za to, da se število bakterij ni zmanjšalo pri inkubaciji s 15 ceponožci, je lahko v pomanjkanju prostora za hranjenje, saj smo imeli vse živali v poskusu v enakem volumnu vode. Večji volumen vode v poskusu bi verjetno ustrezal tudi efiram, ki pri hranjenju utripajo, in za gibanje potrebujejo več prostora. Poskuse bi bilo zanimivo ponoviti pri večji količini bakterij, morda lahko uhati klobučnjak, tako kot nekateri drugi nevretenčarji, bakterije zaužije le v optimalnih razmerah glede števila in vrste bakterij (Austin in Baker, 1988).

Če povzamem predloge za izboljšavo poskusa z radioaktivno označenimi bakterijami, te vključujejo izvedbo poskusa v večjih volumnih morske vode, pri večjem številu bakterij. Vendar bi bili bolj problematični veliki volumni bakterijske kulture in količina dodanega ^3H levcina. Verjetno bi v tem primeru morali vzpostaviti kroženje vode, da bi bila razporeditev bakterij povsod enakomerna. Poskusili bi lahko tudi z večjim številom živali, saj so morda razlike v radioaktivnosti pri številu živali, ki smo jih uporabili v poskusu premajhne za zaznavo. Uporabili bi lahko večje število ponovitev za štetje bakterij in merjenje radioaktivnosti, tudi pri kontrolah, izvedli bi lahko tudi poskus privzema označenega levcina direktno v polipe in efire. Če upoštevamo vse to, lahko ugotovimo, da naša metoda verjetno ni najprimernejša za merjenje privzema bakterij pri uhatem klobučnjaku in ceponožcih. Alternativa radioaktivnega označevanja bi lahko bila fluorescentno označevanje bakterij, s to metodo bi lahko tudi sledili prebavnim potem s fluorescenčno mikroskopijo, kar so pri klobučnjaških polipih že delali (Bumann in Jarms, 1997).

Glavni vir prehrane vseh stadijev uhatega klobučnjaka so ceponožni raki. Poleg tega raziskovalci poročajo o celem spektru hrane, ki jo privzemajo polipi in efire uhatega klobučnjaka (pregl. 8). Polipi in efire so torej pri prehrani precej neselektivni in ko je hrane v izobilju, lahko celotno gastralno votlino napolnijo s plenom, kar smo opazili med delom s temi živalmi.

Preglednica 8: Seznam vrst plena polipov in efir uhatega klobučnjaka. Hranjenje je bilo opaženo v laboratoriju ali v naravi. Oznake: DOM – raztopljena organska snov, POM – delci organske snovi. V preglednem članku (Lucas in sod., 2012) in v knjigi (Arai, 1997) so avtorji originalnih člankov navedeni v referencah teh del.

		Stadij uhatega klobučnjaka	
		polip	efira
Vrsta plena	ceponožci in navpliji	Östman, 1997; Arai, 1997; Lucas in sod., 2012	Sullivan in sod., 1997; Båmstedt in sod., 2001; Riisgård in Madsen, 2011
	solinski rakci in navpliji	Arai, 1997; Wang in sod., 2014	Sullivan in sod., 1997; Han in Uye, 2010; Riisgård in Madsen, 2011
	raki vitičnjaki in navpliji		Sullivan in sod., 1997; Riisgård in Madsen, 2011
	vodne bolhe	Östman, 1997	
	drugi raki in nj. ličinke	Östman, 1997; Arai, 1997	
	ribje ličinke	Östman, 1997, Arai, 1997; Lucas in sod., 2012	
	ščetinočeljjustnice	Östman, 1997	
	mногошčetinci in nj. ličinke	Östman, 1997	
	mehkužci in ličinke	Arai, 1997; Lucas in sod., 2012	Riisgård in Madsen, 2011
	planule in polipi drugih vrst klobučnjakov	Arai, 1997	
	hidromeduze	Östman, 1997	Sullivan in sod., 1997
	kotačniki		Sullivan in sod., 1997; Riisgård in Madsen, 2011
	migetalkarji	Kamiyama, 2011	Zoccarato in sod, 2015
	dinoflagelati		Zoccarato in sod, 2015
	fitoplankton		Båmstedt in sod., 2001; Zoccarato in sod, 2015
	POM		Båmstedt in sod., 2001
	DOM	Shick, 1975	Skikne in sod., 2009



Slika 18: Shematski prikaz trofičnih interakcij med posameznimi elementi prehranske verige, ki smo jih obravnavali v nalogi. Z rdečimi puščicami je prikazano prehranjevanje, z modrimi puščicami pa sproščanje DOM.

6 SKLEPI

- Za raziskave histološke zgradbe polipov smo preizkusili različne histološke in histokemijske tehnike priprave vzorcev. Kot najbolj primerna tehnika se je izkazalo vklapljanje v parafin in barvanje s HE in AM. Za ohranitev sluzi pa je bila najboljša tehnika zamrzovanja vzorcev.
- Ektoderm in gastroderm polipov uhatega klobučnjaka vsebuje mukusne celice in veliko sluzi. Prisotni mucini so tako kisle kot tudi nevtralne narave.
- Za lokalizacijo bakterij v sluzi smo preizkusili tehniki elektronske mikroskopije, SEM in TEM. Na površini polipov in v sluzi nismo našli večjega števila bakterij, kar je lahko tudi posledica postopkov pri pripravi preparatov za elektronsko mikroskopijo.
- S tehniko negativnega kontrasta smo v sluzi opazili nekaj bakterij, vendar njihovega izvora in vloge ne moremo razložiti.
- Število heterotrofnih bakterij v morski vodi se v prisotnosti polipov poveča, kar povezujemo z izločanjem sluzi in drugih snovi, ki jih bakterije potrebujejo za rast.
- Poskusi merjenja privzema s ^3H označenih bakterij se v našem primeru niso izkazali za zelo natančno metodo, vendar so pokazali določen vzorec.
- Efire, polipi in ceponožci lahko v določenih razmerah privzemajo bakterije. Predvidevamo, da jih lahko uporabijo kot hrano, vendar tega s poskusi nismo potrdili.
- Polipi in efire uhatega klobučnjaka vplivajo na delovanje in strukturo mikrobne zanke.

7 POVZETEK

Negativni vplivi masovnega pojavljanja želatinoznega planktona na ribogojnice, turizem in drugo obalno industrijo so klobučnjake postavili v ospredje raziskav favne Jadranskega morja. Vzroki za množične pojave in spremembe v velikosti populacij nekaterih meduz niso povsem znani, vendar raziskave kažejo, da so vpleteni tudi človekovi vplivi na morsko okolje.

Uhati klobučnjak - *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758) je ožigalkar iz razreda klobučnjakov (Scyphozoa). S svojimi varietetami je najbolj razširjena vrsta klobučnjakov, ki jo lahko najdemo v obalnih vodah (Kramp, 1961), med drugim tudi v slovenskem morju. Klobučnjaki imajo kompleksen življenjski cikel, ki vključuje planktonsko meduzo, ki se razmnožuje spolno in bentoški polip, ki predstavlja nespolno generacijo. Polipi imajo pri vzdrževanju meduznih populacij pomembno vlogo, zato tudi raziskav drugih stadijev poleg meduz ne smemo zanemariti. Polipi so namreč ključni pri dolgoročnem preživetju populacij meduz med neugodnimi razmerami. Odličen habitat za polipe so senčne površine in umetni materiali, kot so pomoli, doki, marine in podobne konstrukcije. Taka mesta lahko najdemo tudi v Jadranu ter tudi v slovenskem obalnem morju, v Luki Koper.

Uhati klobučnjak v takih okoljih kontrolira strukturo prehranjevalnih spletov in lahko, ker ima malo naravnih plenilcev, postane namesto rib glavni plenilec v ekosistemu. S svojimi izločki vpliva tudi na biogeokemijske procese in ekološko stanje morja. Le nekatere študije nakazujejo, da klobučnjaki vplivajo na rast in vrstno sestavo bakterioplanktona. Bakterije in zooplankton so lahko tesno povezani s skupnim pojavljanjem in ekološkimi funkcijami ter ustvarjajo dinamične in kompleksne medsebojne odnose (Olesen, 1995; Malej in sod., 2006; Graham in sod., 2009; Tang in sod., 2010; Tinta in sod., 2012; D'Ambra in sod., 2013).

Namen magistrske naloge je bil oceniti vpliv različnih stadijev, predvsem polipov uhatega klobučnjaka, na posamezne člene prehranske verige, s poudarkom na mikrobni populaciji in procesih mikrobne zanke. V prvem delu naloge smo uporabili svetlobno mikroskopijo in vrstično ter presevno elektronsko mikroskopijo za analizo zgradbe polipov ter preverjanje prisotnosti sluzi in mikroorganizmov na preparatih polipov uhatega klobučnjaka. V drugem delu naloge smo poskušali oceniti vpliv različnih življenjskih stadijev uhatega klobučnjaka na posamezne člene prehranske verige ter na mikrobno populacijo. Pri tem smo zasnovali eksperimente, kjer smo s ^3H označene bakterije dodajali polipom in efirm uhatega klobučnjaka ter ceponožcem, ki v naravi predstavljajo glavnino njihove hrane. Nato smo preverili ali so živali privzemale s ^3H označene bakterije tako, da smo s scintilacijskim števcem merili radioaktivne impulze pred in po inkubaciji polipov, efir in ceponožcev z označenimi bakterijami. Uporabili smo tudi tehniko štetja bakterij s pretočno citometrijo in epifluorescentno mikroskopijo.

Z različnimi metodami priprave histoloških vzorcev in štirimi tehnikami barvanja smo preučili zgradbo polipov. Histokemijski reakciji z AB in PAS nakazujeta na to, da vsebuje telesna stena polipov veliko kislih in nevtralnih mucinov ali druge glikoproteine, ki jih najdemo v sluzi in mukusnih celicah. Z nekaterimi metodami smo na pedalnem disku polipa odkrili mikroorganizme, ki vsebujejo klorofil, najverjetneje alge, ki uspevajo na substratih kamor se pritrdijo polipi. Tehnika vrstične elektronske mikroskopije nam je razkrila raznolikost površine polipa uhatega klobučnjaka. Površino ektoderma in gastroderma pokrivajo cilije, vidimo lahko skupke sluzi in veliko nematocist. S pomočjo negativnega kontrasta (TEM) smo v maceratu polipa zasledili nekaj paličastih bakterij in bakteriofagov ter veliko struktur neznanega izvora.

Rezultati štetja heterotrofnih bakterij v morski vodi kažejo, da se število bakterij v prisotnosti polipov uhatega klobučnjaka po 24 urah inkubacije močno poveča (62-krat). To je verjetno posledica prisotnosti organske snovi, morda DOM, ki jo v obliki sluzi izločajo polipi in jo bakterije lahko uporabijo za rast. Poskusi s ^3H bakterijami nakazujejo na sposobnost polipov in efir za privzem bakterij, vendar manjšo kot je bila opažena za ceponožce. Morda polipi in efire ter ceponožci lahko privzemajo bakterije v primeru, ko se te združujejo v skupke, kar je razkrila fluorescentna mikroskopija naših vzorcev.

Ali lahko uhati klobučnjak bakterije uporabi kot vir hrane zaenkrat še ni znano, vendar smo s poskusi potrdili, da polipi in efire vplivajo na delovanje in strukturo mikrobne zanke.

8 VIRI

- Arai M. N. 1997. A functional biology of Scyphozoa. London, Chapman & Hall: 327 str.
- Austin D. A., Baker, J. H. 1988. Fate of bacteria ingested by larvae of the freshwater mayfly, *Ephemera danica*. Microbial Ecology, 15, 3: 323–332
- Avian M., Rottini Sandrini L. 1994. History of Scyphomedusae in the Adriatic sea. Bollettino della Societ a Adriatica di scienze, 75: 5-12
- Azam F. 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. Science, 280, 5364: 694–696
- Azam F., Malfatti F. 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. Nature Reviews. Microbiology, 5, 10: 782–791
- Azam F., Worden A. 2004. Microbes, molecules, and marine ecosystems. Science, 303, 5664: 1622–1624
- Båmstedt U., Wild B., Martinussen M. B. 2001. Significance of food type for growth of ephyrae *Aurelia aurita* (Scyphozoa). Marine Biology, 139, 4: 641–650
- Bickel S. L., Tang, K. W. 2014. Zooplankton-associated and free-living bacteria in the York River, Chesapeake Bay: comparison of seasonal variations and controlling factors. Hydrobiologia, 722, 1: 305–318
- Bancroft J. D., Gamble M. 2008. Theory and practice of histological techniques. 6th ed. London, Churchill Livingstone: 725 str.
- Bornhofft L., New England aquarium. <http://galleries.neaq.org/2011/12/behind-scenes-look-at-jellies.html> (14.7.2016)
- Brotz, L., Pauly, D. 2012. Jellyfish populations in the Mediterranean Sea. Acta Adriatica, 53, 2: 213–232
- Bumann D., Jarms G. 1997. Localization of digestion activities in polyps of *Nausithoe planulophora* and *Thecoscyphus zibrowii* (Coronatae, Scyphozoa, Cnidaria). Helgoländer Meeresuntersuchungen, 51: 477–485
- Carman K. R., Dobbs, F. C. 1997. Epibiotic microorganisms on copepods and other marine crustaceans. Microscopy Research and Technique, 37, 2: 116–135

- Chapman D. M. 1973. Behavior and flagellar currents in coronate polyps (Scyphozoa) and comparisons with semaeostome polyps. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 25, 2-3: 214–227
- Cnudde C., Moens T., Hoste B., Willems A., De Troch, M. 2013. Limited feeding on bacteria by two intertidal benthic copepod species as revealed by trophic biomarkers. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 2: 301–309
- Cohen M., Varki N. M., Jankowski M. D., Gagneux, P. 2012. Using unfixed, frozen tissues to study natural mucin distribution. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 67, e3928, doi: 10.3791/3928: 8 str.
- Condon R. H., Graham W. M., Duarte C. M., Pitt K. A., Lucas C. H., Haddock, S. H., Sutherland K. R., Robinson K. L., Dawson M. N., Decker M. B., Mills, C. E., Purcell, J. E., Malej A., Mianzan H., Uye, S. I., Gelcich S., Madin L. 2012. Questioning the rise of gelatinous zooplankton in the World's oceans. *BioScience*, 62, 2: 160–169
- Condon R. H., Steinberg D. K., Bronk D. A. 2010. Production of dissolved organic matter and inorganic nutrients by gelatinous zooplankton in the York River estuary, Chesapeake Bay. *Journal of Plankton Research*, 32, 2: 153–170
- Condon R. H., Steinberg D. K., del Giorgio P. A., Bouvier, T. C., Bronk, D. A., Graham W. M., Ducklow H. W. 2011. Jellyfish blooms result in a major microbial respiratory sink of carbon in marine systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 25: 10225–10230
- D'Ambra I., Graham W. M., Carmichael R. H., Malej A., Onofri V. 2013. Predation patterns and prey quality of medusae in a semi-enclosed marine lake: implications for food web energy transfer in coastal marine ecosystems. *Journal of Plankton Research*, 35, 6: 1305–1312
- Dawson M. N. 2003. Macro-morphological variation among cryptic species of the moon jellyfish, *Aurelia* (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine Biology*, 143, 2: 369–379
- Dawson M. N., Hamner W. M. 2009. A character-based analysis of the evolution of jellyfish blooms: adaptation and exaptation. *Hydrobiologia*, 616, 1: 193–215
- Dawson M. N., Martin L. E. 2001. Geographic variation and ecological adaptation in *Aurelia* (Scyphozoa, Semaestomeae): some implications from molecular phylogenetics. *Hydrobiologia*, 451: 259–273
- Doores S., Cook T. M. 1976. Occurrence of *Vibrio* and other bacteria on the sea nettle, *Chrysaora quinquecirrha*. *Microbial Ecology*, 3, 1: 31–40

- Duarte C. M., Pitt K. A., Lucas C. H., Purcell J. E., Uye S. I., Robinson, K., Brotz L., Decker M. B., Sutherland K. R., Malej A., Madin L., Mianzan, H., Gili J. M., Fuentes V., Atienza D., Pages F., Breitbart D., Malek J., Graham W. M., Condon, R. H. 2012. Is global ocean sprawl a cause of jellyfish blooms? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11, 2: 91–97
- Ducklow H. W., Mitchell R. 1979. Composition of mucus released by coral reef coelenterates. *Limnology and Oceanography*, 24, 4: 706–714
- Fenchel T. 1988. Marine plankton food chains. *Annual Review of Ecology & Systematics*, 19, 19–38
- Frank P., Bleakney J. S. 1976. Histology and sexual reproduction of the anemone *Nematostella vectensis* Stephenson 1935. *Journal of Natural History*, 10, 4: 441–449
- Fraune S., Augustin R., Anton-Erxleben F., Wittlieb J., Gelhaus C., Klimovich V. B., Samoilovich, M. P., Bosch, T. C. G. 2010. In an early branching metazoan, bacterial colonization of the embryo is controlled by maternal antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 42: 18067–18072
- Fraune S., Bosch T. C. G. 2007. Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 32: 13146–13151
- Fredrick W. S., Ravichandran S. 2010. Anti microbial activity of the cnidarian blue button *Porpita porpita* (Linnaeus, 1758). *Middle-East Journal of Scientific Research*, 5, 5: 355–358
- Fuchs B., Wang W., Graspeuntner S., Li Y., Insua S., Herbst, E. M., Dirksen P., Böhm A. M., Hemmrich, G., Sommer F., Domazet-Lošo T., Klostermeier U. C., Anton-Erxleben F., Rosenstiel P., Bosch, T. C. G., Khalturin K. 2014. Regulation of polyp-to-jellyfish transition in *Aurelia aurita*. *Current Biology*, 24, 3: 263–273
- Goldberg W. M. 2002. Feeding behavior, epidermal structure and mucus cytochemistry of the scleractinian *Mycetophyllia reesi*, a coral without tentacles. *Tissue and Cell*, 34, 4: 232–245
- Graham W. M., Chiaverano L., D. 2009. Fish and jellyfish: using the isolated marine “lakes” of Mljet Island, Croatia, to explore larger marine ecosystem-based management approaches. *Annales Series Historia Naturalis*, 719: 39–48

- Hamner W. M., Dawson M. N. 2009. A review and synthesis on the systematics and evolution of jellyfish blooms: advantageous aggregations and adaptive assemblages. *Hydrobiologia*, 616, 1: 161–191
- Han C.-H., Uye S.-I. 2010. Combined effects of food supply and temperature on asexual reproduction and somatic growth of polyps of the common jellyfish *Aurelia aurita* s. l. *Plankton and Benthos Research*, 5, 3: 98–105
- Hanoaka K., Ohno H., Wada N., Ueno S., Goessler W., Kuehnelt D., Schlagenhafen C., Kaise T., Irgolic K. J. 2001. Occurrence of organo-arsenicals in jellyfishes and their mucus. *Chemosphere*, 44: 743–749
- Harris J. M. 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microbial Ecology*, 25, 3: 195–231
- Hay S. 2006. Marine ecology: Gelatinous bells may ring change in marine ecosystems. *Current Biology*, 16, 17: 679–682
- Heeger T., Möller H. 1987. Ultrastructural observations on prey capture and digestion in the scyphomedusa *Aurelia aurita*. *Marine Biology*, 96: 391–400
- Heidelberg J. F., Heidelberg K. B., Colwell R. R. 2002. Bacteria of the gamma-subclass Proteobacteria associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 11: 5498–5507
- Hočevár S. 2013. Populacijska dinamika polipov uhatega klobučnjaka (*Aurelia aurita* s.l.) v Koprskem zalivu. Diplomsko delo. Koper, Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije: 52 str.
- Holst S., Jarms G. 2007. Substrate choice and settlement preferences of planula larvae of five Scyphozoa (Cnidaria) from German Bight, North Sea. *Marine Biology*, 151, 3: 863–871
- Ishii, H., & Tanaka, F. 2001. Food and feeding of *Aurelia aurita* in Tokyo Bay with an analysis of stomach contents and a measurement of digestion times. *Hydrobiologia*, 451: 311–320. <http://doi.org/10.1023/A:1011814525325>
- ITIS: Integrated Taxonomic Information System.
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=5170 (2. 8. 2016)
- Johnston, I. S., Rohwer, F. 2007. Microbial landscapes on the outer tissue surfaces of the reef-building coral *Porites compressa*. *Coral reefs*, 26, 2: 375–383

- Kamiyama T. 2011. Planktonic ciliates as a food source for the scyphozoan *Aurelia aurita* (s.l.): Feeding activity and assimilation of the polyp stage. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407, 2: 207–215
- Kasahara S., Bosch T. C. G. 2003. Enhanced antibacterial activity in *Hydra* polyps lacking nerve cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 27, 2: 79–85
- Kogovšek T., Bogunović B., Malej A. 2010. Recurrence of bloom-forming scyphomedusae: wavelet analysis of a 200-year time series. *Hydrobiologia*, 645, 1: 81–96
- Kramp P. L. 1961. Synopsis of the medusae of the world. *Journal of Marine Biological Association of United Kingdom*, 40: 1–469
- Leone A., Lecci R. M., Durante M., Meli F., Piraino, S. 2015. The bright side of gelatinous blooms: Nutraceutical value and antioxidant properties of three Mediterranean jellyfish (Scyphozoa). *Marine Drugs*, 13, 8: 4654–4681
- Loeb J. M., Blanquet S. R. 1973. Feeding behaviour in polyps of the Chesapeake bay sea nettle, *Chrysaora quinquecirrha* (Desor, 1848). *The Biological Bulletin*, 145: 150–158
- Lucas C. H. 2001. Reproduction and life history strategies of the common jellyfish, *Aurelia aurita*, in relation to its ambient environment. *Hydrobiologia*, 451: 229–246
- Lucas C. H., Graham W. M., Widmer C. 2012. Jellyfish life histories: role of polyps in forming and maintaining Scyphomedusa populations. V: *Advances in Marine Biology*. Lesser M. (ed.). 1st ed. Amsterdam, Academic Press: 132–196
- Makabe R., Furukawa R., Takao M., Uye S. I. 2014. Marine artificial structures as amplifiers of *Aurelia aurita* s.l. blooms: a case study of a newly installed floating pier. *Journal of Oceanography*, 70, 5: 447–455
- Malačič V., Celio M., Čermelj B., Bussani A., Comici C. 2006. Interannual evolution of seasonal thermohaline properties in the Gulf of Trieste (northern Adriatic) 1991–2003. *Journal of geophysical research*, 111: C08009. doi: 10.1029/2005JC003267: 16 str.
- Malej A., Turk V., Lučić D., Benović A. 2006. Direct and indirect trophic interactions of *Aurelia* sp. (Scyphozoa) in a stratified marine environment (Mljet Lakes, Adriatic Sea). *Marine Biology*, 151, 3: 827–841
- Malej A., Kogovšek T., Ramšak A., Catenacci, L. 2012. Blooms and population dynamics of moon jellyfish in the Northern Adriatic. *Cahiers de Biologie Marine*, 54: 337–342

- Masuda A., Baba T., Dohmae N., Yamamura M., Wada H., Ushida K. 2007. Mucin (qni mucin), a glycoprotein from jellyfish, and determination of its main chain structure. *Journal of Natural Products*, 70, 7: 1089–1092
- Miyake H., Terazaki, M., Kakinuma, Y. 2002. On the polyps of the common jellyfish *Aurelia aurita* in Kagoshima Bay. *Journal of Oceanography*, 58: 451–459
- Møller E. F., Thor P., Nielsen T. G. 2003. Production of DOC by *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* through sloppy feeding and leakage from fecal pellets. *Marine Ecology Progress Series*, 262: 185–191
- Møller E. F., Rieman L., Søndergaard M. 2007. Bacteria associated with copepods: abundance, activity and community composition. *Aquatic Microbial Ecology*, 47, 1: 99–106
- Morales-Landa J. L., Zapata-Perez O., Cedillo-Rivera R., Segura-Puertas, L., Sima-Alvarez R., Sanchez- Rodriguez J. 2007. Antimicrobial , antiprotozoal and toxic activities of Cnidarian Extracts from the Mexican Caribbean Sea. *Pharmaceutical Biology*, 45, 1: 37–43
- Olesen N. J. 1995. Clearance potential of jellyfish *Aurelia aurita*, and predation impact on zooplankton in a shallow cove. *Marine Ecology Progress Series*, 124, 1-3: 63–72
- Östman C. 1997. Abundance, feeding behaviour and nematocysts of scyphopolyps (Cnidaria) and nematocysts in their predator, the nudibranch *Coryphella verrucosa* (Mollusca). *Hydrobiologia*, 355: 21–28
- Ouwerkerk J. P., de Vos W. M., Belzer C. 2013. Glycobiome: Bacteria and mucus at the epithelial interface. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 27, 1: 25–38
- Ovchinnikova T. V., Balandin S. V., Aleshina G. M., Tagaev A. A., Leonova Y. F., Krasnodembsky E. D., Men'shenin A. V, Kokryakov V. N. 2006. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348: 514–523
- Parracho T., Morais Z. 2015. Catostylus tagi: partial rDNA sequencing and characterisation of nematocyte structures using two improvements in jellyfish sample preparation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 21, 1: 40. doi: 10.1186/s40409-015-0037-4: 10 str.

- Pascal P. Y., Dupuy C., Mallet C., Richard P., Niquil N. 2008. Bacterivory by benthic organisms in sediment: Quantification using ^{15}N -enriched bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 355, 1: 18–26
- Pearson R., Tellam R., Xu B., Zhao Z., Wilcox M., Kritaya K. 2011. Isolation, biochemical characterization and anti-adhesion property of mucin from the blue blubber jellyfish (*Catostylus mosaicus*). *Bioscience Methods*, 4: 21–30
- Pitt K. A., Welsh D. T., Condon R. H. 2009. Influence of jellyfish blooms on carbon, nitrogen and phosphorus cycling and plankton production. *Hydrobiologia*, 616, 1: 133–149
- Porter K. G., Feig Y. S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25, 5: 943–948
- Purcell J. E., Uye S. I., Lo W. T. 2007. Anthropogenic causes of jellyfish blooms and their direct consequences for humans: a review. *Marine Ecology Progress Series*, 350: 153–174
- Ramšak A., Stopar K., Malej A. 2012. Comparative phylogeography of meroplanktonic species, *Aurelia* spp. and *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa) in European seas. *Hydrobiologia*, 690, 1: 69–80
- Riisgård H. U., Madsen C. V. 2011. Clearance rates of ephyrae and small medusae of the common jellyfish *Aurelia aurita* offered different types of prey. *Journal of Sea Research*, 65, 1: 51–57
- Russell H.D. 1963. Notes on methods for the narcotization, killing, fixation and preservation of marine organisms. Woodshole M.A., Marine biological laboratory: 84 str.
- Schroth W., Jarms G., Streit B., Schierwater B. 2002. Speciation and phylogeography in the cosmopolitan marine moon jelly, *Aurelia* sp. *BMC Evolutionary Biology*, 2: 1, doi: doi: 10.1186/1471-2148-2-1: 10 str.
- Schuett C., Doepke H. 2010. Endobiotic bacteria and their pathogenic potential in cnidarian tentacles. *Helgoland Marine Research*, 64, 3: 205–212
- Shanks A., Graham W. 1988. Chemical defense in a scyphomedusa. *Marine Ecology Progress Series*, 45: 81–86
- Shick J. M. 1975. Uptake and utilization of dissolved glycine by *Aurelia aurita* scyphistomae: temperature effects on the uptake process; nutritional role of dissolved amino acids. *Biological Bulletin*, 148, 1: 117–140

- Skikne S. A., Sherlock R. E., Robison B. H. 2009. Uptake of dissolved organic matter by ephyrae of two species of scyphomedusae. *Journal of Plankton Research*, 31, 12: 1563–1570
- Sochard M. R., Wilson D. F., Austin B., Colwell R. R. 1979. Bacteria associated with the surface and gut of marine copepods. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 4: 750–759
- Sorokin Y. I. 1973. On the feeding of some scleractinian corals with bacteria and dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, 18, 3: 380–386
- Spangenberg D. B. 1964. New observations on *Aurelia*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 83, 4: 448–455
- Spangenberg D. B. 1974. Thyroxine in early strobilation in *Aurelia aurita*. *Integrative and Comparative Biology*, 14, 2: 825–831
- Sperandio B., Fischer N., Sansonetti P. J. 2015. Mucosal physical and chemical innate barriers: lessons from microbial evasion strategies. *Seminars in Immunology*, 27, 2: 111–118
- Sullivan B. K., Suchman C. L., Costello J. H. 1997. Mechanics of prey selection by ephyrae of the scyphomedusa *Aurelia aurita*. *Marine Biology*, 130, 2: 213–222
- Takao M., Okawachi H., Uye, S. 2014. Natural predators of polyps of *Aurelia aurita* s.l. (Cnidaria: Scyphozoa: Semaestomeae) and their predation rates. *Plankton & Benthos Research*, 9, 2: 105–113
- Tang K. W., Turk V., Grossart H. P. 2010. Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 61, 3: 261–277
- Tinta T. 2011. Bacterial community structure and function in the gulf of Trieste with some application studies. PhD thesis. Nova Gorica, University of Nova Gorica, Graduate school: 130 str.
- Tinta T., Kogovšek T., Malej A., Turk V. 2012. Jellyfish modulate bacterial dynamic and community structure. *PLoS ONE*, 7, 6: e39274, doi: 10.1371/journal.pone.0039274: 11 str.
- Tinta T., Malej A., Kos M., Turk V. 2010. Degradation of the Adriatic medusa *Aurelia* sp. by ambient bacteria. *Hydrobiologia*, 645, 1: 179–191

- Tkavc R. 2012. Mikrobne združbe solinskega raka *Artemia* sp. in izbranih solinskih mikrobnih preprog. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 152 str.
- Turk V., Lučić D., Flander-Putrlje V., Malej A. 2008. Feeding of *Aurelia* sp. (Scyphozoa) and links to the microbial food web. *Marine Ecology*, 29, 4: 495–505
- Turk V., Mozetič P., Malej A. 2007. Overview of eutrophication-related events and other irregular episodes in Slovenian sea (Gulf of Trieste, Adriatic sea). *Annales Series Historia Naturalis*, 17, 2: 197–216
- Traunšek U. 2002. Sekvenčna analiza intronskih regij gena za ekvistatin in imunolokalizacija ekvistatina, inhibitorja cisteinskih in aspartatnih proteinaz iz konjske vetrnice (*Actinia equina* L.). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 192 str.
- Wang N., Li C., Liang Y., Shi Y., Lu J. 2014. Prey concentration and temperature effect on budding and strobilation of *Aurelia* sp. 1 polyps. *Hydrobiologia*, 754, 1: 125–134
- Watanabe H. 2002. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea*, 21, 2 Suppl 1: S17–S22
- Weiland-Bräuer N., Neulinger S. C., Pinnow N., Kunzel S., Baines J. F., Schmitz R. A. 2015. Composition of bacterial communities associated with *Aurelia aurita* changes with compartment, life stage, and population. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 17: 6038–6052
- WoRMS: World Register of Marine Species.
<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=135263> (18.2. 2016)
- Yu T., Yin Q., Song X., Zhao R., Shi X., Zhang X. H. 2013. *Aquimarina longa* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of *Aquimarina muelleri*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, PART4: 1235–1240
- Zoccarato L., Celussi M., Pallavicini A., Fonda Umani, S. 2016. *Aurelia aurita* ephyrae reshape a coastal microbial community. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1–16
- Zubkov M. V., Sleigh M. A. 1995. Ingestion and assimilation by marine protists fed on bacteria labeled with radioactive thymidine and leucine estimated without separating predator and prey. *Microbial Ecology*, 30, 2: 157–170

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila komisiji, ki je bdela nad nastankom končne verzije tega dela. In sicer, recenzentu izr. prof. dr. Rudiju Verovniku in predsednici komisije, doc., dr. Poloni Zalar za korektno in hitro delo. Somentorici, prof. dr. Valentini Turk, ki je uresničila mojo dolgoletno željo po delu z morskimi organizmi, ki se je izkazalo za zelo zanimivo in me je veliko naučilo. Mentorici, prof. dr. Jasni Štrus za zelo koristne napotke, vzpodbudo in učinkovito organizacijo zadnjih faz nastajanja naloge.

Za pomoč v laboratoriju pri histoloških tehnikah se zahvaljujem dr. Poloni Mrak. Zahvaljujem se tudi izr. prof. dr. Roku Kostanjšku in dr. Magdi Tušek Žnidarič za delo z elektronsko mikroskopijo. Vsem trem sem hvaležna tudi za koristne nasvete in prijaznost.

V nadaljevanju se zahvaljujem José-ju M. C. Gonçalves in Petri Lučić – thank you both for feeding the polyps in my absence and for the help in the lab. And thank you for being such a good company during my stay in Piran ☺. Poleg tega se zahvaljujem tudi drugim zaposlenim na MBP, ki so mi kakorkoli pomagali pri delu.

Zahvala gre tudi mojim staršem. Očetu, ki je v meni zbudil ljubezen do morja in mami za podporo ob katerikoli uri dneva in vse nasvete, ki jih še vedno najbolj cenim. Babici, za varen pristan med vsemi viharji in najboljša kosila. Vsem prijateljem, ki ste me bodrili, bili potrpežljivi z mano in me predvsem poslušali, ko sem to potrebovala. Hvala Eriki, ker prenašaš celo paleto mojih čustev in mi vedno stojiš ob strani. Hvala moji Valentini, ker plavaš skupaj z mano, tudi ko gre cela jata v drugo smer! Hvala vsem, ki ste v mojih mislih, četudi sem na drugem koncu sveta!

PRILOGE

Priloga A: Radioaktivnosti v dpm in dpm/ml, ki smo jo izmerili pred (t_0) in po inkubaciji (t_{end}) v prvem poskusu. Oznake obravnav: bP-polipi, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bP_K- kontrola: mrtvi polipi, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bP		bP_K	
	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v polipih (dpm)	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v polipih (dpm)
t_0	6621 $\pm$ 1994	/	9510	/
t_{end}	6876 $\pm$ 3051	185 $\pm$ 36	8172	74

Priloga B: Radioaktivnosti v dpm in dpm/ml, ki smo jo izmerili pred (t_0) in po inkubaciji (t_{end}) v drugem poskusu. Oznake obravnav: bP-polipi, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bP_K- kontrola: mrtvi polipi, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bP		bP_K	
	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v polipih (dpm)	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v polipih (dpm)
t_0	137920 $\pm$ 21684	/	125583	/
t_{end}	115083 $\pm$ 16796	5171 $\pm$ 987	127122	6683

Priloga C: Radioaktivnosti v dpm in dpm/ml, ki smo jo izmerili pred (t_0) in po inkubaciji (t_{end}) pri efirah v drugem poskusu. Oznake obravnav: bE-efire, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bE_K- kontrola: mrtve efire, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bE		bE_K	
	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v efirah (dpm)	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v efirah (dpm)
t_0	143280 $\pm$ 9810	/	131455	/
t_{end}	117360 $\pm$ 8976.1	4627 $\pm$ 1772	130016	8810

Priloga D: Radioaktivnosti v dpm in dpm/ml, ki smo jo izmerili pred (t_0) in po inkubaciji (t_{end}) pri ceponožcih v drugem poskusu. Označe obravnav: bC15 - 15 ceponožcev, ki smo jim dodali ^3H označene bakterije, bC9- 9 ceponožcev, ki smo jim dodali označene bakterije. Rezultati so podani kot povprečje $\pm$ standardna deviacija.

	bC15		bC9	
	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v ceponožcih (dpm)	^3H bakterije (dpm/ml)	^3H bakterije v ceponožcih (dpm)
t_0	137274 ± 28187	/	103766 ± 4771	/
t_{end}	126889 ± 20914	17410 ± 597	89502 ± 12171	25296 ± 6330