

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

David ŠKUFGA

**SPREMLJANJE POKAZATELJEV FIZIOLOŠKEGA  
STANJA VODNIH OSLIČKOV IZ JAMSKEGA IN  
POVRŠINSKEGA OKOLJA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

David ŠKUFCA

**SPREMLJANJE POKAZATELJEV FIZIOLOŠKEGA STANJA  
VODNIH OSLIČKOV IZ JAMSKEGA IN POVRŠINSKEGA OKOLJA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

**MONITORING OF PHYSIOLOGICAL STATE BIOMARKERS OF  
WATER LICE FROM CAVE AND SURFACE WATER  
ENVIRONMENTS**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

*»There is a single light of science, and to brighten it anywhere is to brighten it everywhere.«*

Isaac Asimov

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. bolonjske stopnje Ekologija in biodiverziteta na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

Senat Oddelka za biologijo je na predlog Komisije za študij 1. in 2. stopnje, dne 20. 2. 2015 odobril temo magistrskega dela in za mentorja imenoval doc. dr. Primoža Zidarja, za somentorico doc. dr. Anito Jemec, za predsednico komisije doc. dr. Simono Prevorčnik ter za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za zagovor:

Predsednik: doc. dr. Simona PREVORČNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Primož ZIDAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Anita JEMEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je magistrsko delo 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.

David Škufca

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2  
DK UDK 574.5(043.2)  
KG *Asellus aquaticus*/vodni osliček/biomarker/monitoring/jama/površinski vodotok  
AV ŠKUFGA, David, diplomiran biolog (UN)  
SA ZIDAR, Primož (mentor)/JEMEC, Anita (somentorica)/SEPČIČ, Kristina (recenzentka)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij ekologije in biodiverzitete  
LI 2016  
IN SPREMLJANJE POKAZATELJEV FIZIOLOŠKEGA STANJA VODNIH OSLIČKOV IZ JAMSKEGA IN POVRŠINSKEGA OKOLJA  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
OP XI, 74 str., 6 pregl., 25 sl., 6 pril., 139 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Vodni osliček, *Asellus aquaticus* (L.), je splošno razširjena vrsta enakonožnega raka. Najdemo ga v različnih površinskih sladkovodnih habitatih, kot tudi v podzemnih vodah. Želeli smo ugotoviti vpliv sezonsko vezanih okoljskih dejavnikov na biomarkerje pri *A. aquaticus* in ugotoviti ali obstajajo razlike v biomarkerjih med površinskimi in jamskimi populacijami. Želeli smo tudi podati smernice za razumevanje bazalnih vrednosti biomarkerjev vodnih osličkov in njihovo potencialno uporabo v biomonitoringu. Merili smo encimsko aktivnost dveh encimov (acetilholinesteraze in glutation-S-transferaze) ter količino treh založnih snovi (lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov). Vrednosti biomarkerjev in količina založnih snovi so se med letnimi časi razlikovale. Encimske aktivnosti so bile načeloma višje poleti. Sezonsko se spreminjajo številne razmere v okolju živali; predvsem temperatura vode je bila močno sezonsko pogojena. Vrednosti encimskih biomarkerjev jamskih živali so bile nižje in stabilnejše. Prav tako so bile pri njih sezonske razlike v količinah založnih snovi manjše. Domnevamo, da je vzrok večja stabilnost temperature in ostalih okoljskih razmer v Planinski jami, v primerjavi s površjem. Jamske populacije *A. aquaticus* bi bile zaradi stabilnejših okoljskih razmer po našem mnenju sicer primernejše za nadaljnje ekološke in ekotoksikološke študije kot površinske, vendar pa ni znan vpliv izlova na te populacije. Potrebno bo še veliko raziskav vplivov okolja na biomarkerje, da bo možna njihova uporaba v naravovarstvene namene.

### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2  
DC UDC 574.5(043.2)  
CX *Asellus aquaticus*/water lice/biomarker/monitoring/cave/surface stream  
AU ŠKUFCA, David  
AA ZIDAR, Primož (supervisor)/JEMEC, Anita (co-advisor)/SEPČIČ, Kristina (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes in Ecology in Biodiversity  
PY 2016  
TI MONITORING OF PHYSIOLOGICAL STATE BIOMARKERS OF WATER LICE FROM CAVE AND SURFACE WATER ENVIRONMENTS  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO XI, 74 p., 6 tab., 25 fig., 6 ann., 139 ref.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI *Asellus aquaticus*, or water lice, is an ubiquitous isopod crustacean. It can be found in various surface freshwater habitats, as well as in underground water. Our aim was to determine the influence of seasonal environmental factors on biomarkers of water lice, as well as to establish whether there are differences between surface and underground populations. We also wanted to give guidelines to the understanding of basal values of biomarkers in water lice and their potential use in biomonitoring. We measured the enzyme activity of two enzymes (acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase), as well as the quantity of energy reserves (lipids, carbohydrates and proteins). There were seasonal differences in the biomarker values that we measured. Enzyme activities tended to be higher in summer and we noticed seasonal differences in energy reserves. Many environmental conditions change during the year – especially temperature had a high seasonal variability. Enzyme activity was lower and more stable in the underground animals. The amount of energy reserves was likewise more stable. We assume that the reason was the more stable temperature as well as other environmental conditions in Planinska jama, compared to surface locations. Underground populations could be more suitable for future ecological and ecotoxicological studies than surface ones, due to the more stable environment. Still, a lot of biomarker research and environmental influences on them must be completed, before they can be used for the protection of our environment.

## KAZALO VSEBINE

|   |             |
|---|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>                            | <b>III</b>  |
| <b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>  | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>   | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>KAZALO SLIK .....</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>KAZALO PRILOG .....</b>  | <b>XI</b>   |
| <br>  |             |
| <b>1 UVOD.....</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....   | 1           |
| 1.2 NAMEN RAZISKOVANJA .....  | 2           |
| 1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....   | 2           |
| <b>2 PREGLED OBJAV.....</b>   | <b>3</b>    |
| 2.1 VRSTA <i>ASELLUS AQUATICUS</i> .....                                    | 3           |
| 2.2 PRIMERJAVA PODZEMNIH IN POVRŠINSKIH ŽIVALI .....                        | 5           |
| <b>2.2.1 Razlike med prilagoditvami podzemnih in površinskih rakov.....</b> | <b>5</b>    |
| 2.3 BIOMARKERJI KOT POKAZATELJI FIZIOLOŠKEGA STANJA .....                   | 7           |
| <b>2.3.1 Opredelitev biomarkerjev .....</b>                                 | <b>7</b>    |
| <b>2.3.2 Uporabnost biomarkerjev v biomonitoringu .....</b>                 | <b>7</b>    |
| 2.4 PROUČEVANI BIOMARKERJI .....  | 8           |
| <b>2.4.1 Aktivnost AChE .....</b>   | <b>8</b>    |
| <b>2.4.2 Aktivnost GST .....</b>  | <b>8</b>    |
| <b>2.4.3 Založne snovi .....</b>  | <b>9</b>    |
| 2.5 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA BIOMARKERJE .....                         | 10          |
| <b>2.5.1 Vplivi na aktivnost AChE .....</b>                                 | <b>10</b>   |
| <b>2.5.2 Vplivi na aktivnost GST .....</b>                                  | <b>12</b>   |
| <b>2.5.3 Vplivi na količino založnih snovi .....</b>                        | <b>13</b>   |
| <b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>   | <b>15</b>   |
| 3.1 LOKACIJE .....  | 15          |
| <b>3.1.1 Opis lokacij .....</b>   | <b>16</b>   |
| <b>3.1.2 Opis vzorčenja .....</b>   | <b>19</b>   |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 3.2          | LABORATORIJSKO DELO.....   | 21        |
| <b>3.2.1</b> | <b>Priprava živali za meritve .....</b>  | <b>21</b> |
| <b>3.2.2</b> | <b>Priprava supernatanta za merjenje encimske aktivnosti in vsebnosti proteinov .....</b>      | <b>21</b> |
| 3.2.2.1      | Priprava kalij fosfatnega pufra (K-P pufer) .....  | 21        |
| 3.2.2.2      | Priprava homogenata .....  | 21        |
| 3.2.2.3      | Priprava supernatanta.....   | 22        |
| <b>3.2.3</b> | <b>Določanje aktivnosti AChE .....</b>   | <b>22</b> |
| 3.2.3.1      | Ellmanov reagent .....   | 22        |
| 3.2.3.2      | Raztopina ATChCl (1M) .....  | 22        |
| 3.2.3.3      | Meritev aktivnosti AChE .....  | 22        |
| <b>3.2.4</b> | <b>Določanje aktivnosti GST.....</b>   | <b>23</b> |
| 3.2.4.1      | Priprava raztopine 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) .....                                     | 23        |
| 3.2.4.2      | Priprava raztopine reduciranega glutationa (GSH).....  | 23        |
| 3.2.4.3      | Meritev aktivnosti GST.....  | 23        |
| <b>3.2.5</b> | <b>Določanje količine proteinov .....</b>  | <b>23</b> |
| 3.2.5.1      | Priprava standardov .....  | 24        |
| 3.2.5.2      | Meritev količine proteinov.....  | 24        |
| <b>3.2.6</b> | <b>Priprava homogenata za določanje količine lipidov in količine ogljikovih hidratov .....</b> | <b>24</b> |
| <b>3.2.7</b> | <b>Določanje količine lipidov .....</b>  | <b>24</b> |
| 3.2.7.1      | Priprava standardov .....  | 24        |
| 3.2.7.2      | Meritev količine lipidov.....  | 25        |
| <b>3.2.8</b> | <b>Določanje količine ogljikovih hidratov .....</b>  | <b>25</b> |
| 3.2.8.1      | Priprava standardov .....  | 25        |
| 3.2.8.2      | Meritev količine ogljikovih hidratov .....   | 25        |
| 3.3          | ANALIZA PODATKOV .....   | 26        |
| <b>3.3.1</b> | <b>Kvantifikacija meritev biomarkerjev.....</b>  | <b>26</b> |
| 3.3.1.1      | Kvantifikacija aktivnosti AChE.....  | 26        |
| 3.3.1.2      | Kvantifikacija aktivnosti GST .....  | 26        |
| 3.3.1.3      | Kvantifikacija količine proteinov.....   | 26        |
| 3.3.1.4      | Kvantifikacija količine lipidov .....  | 26        |



|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 3.3.1.5      | Kvantifikacija količine ogljikovih hidratov .....        | 27        |
| <b>3.3.2</b> | <b>Statistična obdelava podatkov .....</b>               | <b>27</b> |
| <b>3.3.3</b> | <b>Grafikoni.....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>4</b>     | <b>REZULTATI .....</b>                                   | <b>28</b> |
| 4.1          | FIZIKALNI IN KEMIJSKI PARAMETRI VODE .....               | 28        |
| 4.2          | SPOLNA SESTAVA VZORČENIH ŽIVALI.....                     | 29        |
| 4.3          | SVEŽA MASA ŽIVALI.....                                   | 30        |
| 4.4          | AKTIVNOST AChE.....                                      | 33        |
| 4.5          | AKTIVNOST GST .....                                      | 36        |
| 4.6          | KOLIČINA LIPIDOV .....                                   | 39        |
| 4.7          | KOLIČINA OGLJIKOVIH HIDRATOV .....                       | 42        |
| 4.8          | KOLIČINA PROTEINOV.....                                  | 45        |
| <b>5</b>     | <b>RAZPRAVA .....</b>                                    | <b>48</b> |
| 5.1          | FIZIKALNI IN KEMIJSKI PARAMETRI VODE .....               | 48        |
| 5.2          | SPOLNA SESTAVA VZORČENIH ŽIVALI.....                     | 48        |
| 5.3          | SVEŽA MASA ŽIVALI.....                                   | 49        |
| 5.4          | AKTIVNOST AChE.....                                      | 50        |
| 5.5          | AKTIVNOST GST .....                                      | 51        |
| 5.6          | KOLIČINA LIPIDOV .....                                   | 53        |
| 5.7          | KOLIČINA OGLJIKOVIH HIDRATOV .....                       | 54        |
| 5.8          | KOLIČINA PROTEINOV.....                                  | 55        |
| 5.9          | ENCIMSKA AKTIVNOST IN ZALOŽNE SNOVI KOT BIOMARKERJI..... | 56        |
| <b>6</b>     | <b>SKLEPI.....</b>                                       | <b>59</b> |
| <b>7</b>     | <b>POVZETEK .....</b>                                    | <b>60</b> |
| <b>8</b>     | <b>VIRI.....</b>   | <b>62</b> |

**ZAHVALA**

**PRILOGE**

## KAZALO PREGLEDNIC

|                       |  |    |
|-----------------------|--|----|
| <b>Preglednica 1:</b> | Fizikalni in kemijski parametri vode v času vzorčenja na različnih lokacijah. ....     | 29 |
| <b>Preglednica 2:</b> | Pregled vrednosti aktivnosti AChE izbranih vrst rakov iz literature. ...               | 51 |
| <b>Preglednica 3:</b> | Pregled vrednosti aktivnosti GST izbranih vrst rakov iz literature. ....               | 52 |
| <b>Preglednica 4:</b> | Pregled vrednosti količine lipidov izbranih vrst rakov iz literature.....              | 53 |
| <b>Preglednica 5:</b> | Pregled vrednosti količine ogljikovih hidratov izbranih vrst rakov iz literature. .... | 54 |
| <b>Preglednica 6:</b> | Pregled vrednosti količine proteinov izbranih vrst rakov iz literature..               | 55 |

## KAZALO SLIK

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Slika 1:</b>  | Odrasli vodni osliček površinske podvrste <i>Asellus aquaticus aquaticus</i> in jamske podvrste <i>A. a. cavernicolus</i> ..... | 3  |
| <b>Slika 2:</b>  | Zemljevid lokacij vzorčenja vodnega oslička. ....   | 15 |
| <b>Slika 3:</b>  | Lokacija vzorčenja vodnega oslička v reki Pivki, 150 m JV od vhoda v Postojnsko jamo. ....                                      | 16 |
| <b>Slika 4:</b>  | Vhod v Planinsko jamo, iz katere teče Unica in lokacija vzorčenja <i>Asellus aquaticus cavernicolus</i> v Planinski jami.....   | 17 |
| <b>Slika 5:</b>  | Lokacija vzorčenja vodnega oslička v strugi Unice, 850 m SZ od Jakovice na Planinskem polju.....                                | 18 |
| <b>Slika 6:</b>  | Lokacija vzorčenja vodnega oslička v močvirnatem gozdu 100 m SZ od Oddelka za biologijo v Ljubljani.....                        | 19 |
| <b>Slika 7:</b>  | Spolna sestava vodnih osličkov glede na letni čas in lokacijo vzorčenja. ....   | 29 |
| <b>Slika 8:</b>  | Grafikoni kvartilov sveže mase vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. ....                                  | 30 |
| <b>Slika 9:</b>  | Grafikoni kvartilov sveže mase vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. ....                                  | 31 |
| <b>Slika 10:</b> | Grafikoni kvartilov sveže mase samcev in samic vodnih osličkov v poletnem in jesenskem obdobju, za vzorčene lokacije. ....      | 32 |
| <b>Slika 11:</b> | Grafikoni kvartilov aktivnosti AChE vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. ....                             | 33 |
| <b>Slika 12:</b> | Grafikoni kvartilov aktivnosti AChE vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije.....                              | 34 |
| <b>Slika 13:</b> | Grafikoni kvartilov aktivnosti AChE samcev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. .... | 35 |
| <b>Slika 14:</b> | Grafikoni kvartilov aktivnosti GST vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. ....                              | 36 |
| <b>Slika 15:</b> | Grafikoni kvartilov aktivnosti GST vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije.....                               | 37 |

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Slika 16:</b> | Grafikoni kvartilov aktivnosti GST samcev in samic vodnih za vzorčene lokacije, osličkov v poletnem in jesenskem obdobju. ....               | 38 |
| <b>Slika 17:</b> | Grafikoni kvartilov količine lipidov vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. ....   | 39 |
| <b>Slika 18:</b> | Grafikoni kvartilov količine lipidov vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. ....   | 40 |
| <b>Slika 19:</b> | Grafikoni kvartilov količine lipidov samcev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. ....             | 41 |
| <b>Slika 20:</b> | Grafikoni kvartilov količine ogljikovih hidratov vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. ....                             | 42 |
| <b>Slika 21:</b> | Grafikoni kvartilov količine ogljikovih hidratov vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. ....                             | 43 |
| <b>Slika 22:</b> | Grafikoni kvartilov količine ogljikovih hidratov samcev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. .... | 44 |
| <b>Slika 23:</b> | Grafikoni kvartilov količine proteinov vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. ....                                       | 45 |
| <b>Slika 24:</b> | Grafikoni kvartilov količine proteinov vodnih osličkov za v treh letnih časih, vzorčene lokacije. ....                                       | 46 |
| <b>Slika 25:</b> | Grafikoni kvartilov količine proteinov samcev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. ....           | 47 |

## KAZALO PRILOG

- PRILOGA A:** Osnovne statistike izmerjenih parametrov
- Preglednica A1:** Osnovne statistike za svežo maso vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase.
- Preglednica A2:** Osnovne statistike za aktivnost AChE vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase.
- Preglednica A3:** Osnovne statistike za aktivnost GST vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase.
- Preglednica A4:** Osnovne statistike za količino lipidov vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase.
- Preglednica A5:** Osnovne statistike za količino ogljikovih hidratov vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase.
- Preglednica A6:** Osnovne statistike za količino proteinov vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase.

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Vodni osliček, *Asellus aquaticus* (Linnaeus, 1758), je po Evraziji razširjena evrieka vrsta enakonožnega raka (Sket, 1994). Je pomemben člen v prehranskih verigah – je detritivor in herbivor (Graca in sod., 1994; Marcus in sod. 1978), hkrati pa je plen za druge živali (Rask in Hiisivuori, 1985; Cockrell, 1984; MacNeil in sod. 2002).

Vodni osliček je pogosto modelni organizem v raziskavah v vodni ekologiji (Hasu in sod., 2008), ekotoksikologiji (Migliore in sod., 1990; Bouskill in sod., 2006; Lukančič in sod., 2010; Bloor in sod., 2005, De Lange in sod., 2006) ter evolucijski in razvojni biologiji (Protas in Jeffery, 2012; Stahl in sod., 2015). Predstavlja tudi potencialen modelni organizem za biomonitoring površinskega in jamskega vodnega okolja.

Eden izmed pokazateljev fizioloških sprememb v živali so spremembe na nivoju celice, med katere sodijo tudi t.i. biokemijski biomarkerji (Van Gestel in Van Brummelen, 1996). Meritve nekaterih biomarkerjev imajo potencial za hitrejše zaznavanje prisotnosti onesnažil v okolju in oceno njihove nevarnosti kot običajne meritve količine posameznih snovi v vodi (Handy in sod., 2003). Proučevanje biomarkerjev v organizmih se uveljavlja kot občutljivo orodje za zaznavanje onesnaženja v okolju s spremljanjem encimskih aktivnosti (Domingues in sod., 2010; Ferreira in sod., 2015; Carvalho in sod., 2013; Handy in sod., 2003) ali količine založnih snovi (Donker, 1992; Ribeiro in sod., 2001, Schill in Köhler, 2004; Smolders in sod., 2004; Durou in sod., 2005).

Raziskave kažejo, da je za načrtovanje poskusa in pravilno interpretacijo izmerjenih vrednosti biomarkerjev ključnega pomena zelo dobro poznavanje bazalnih vrednosti merjenih biomarkerjev (Jemec in sod., 2010; Ferreira in sod., 2010). Organizmi prebivajo v okolju, ki se stalno spreminja, zato morajo svoje fiziološke procese delno prilagoditi razmeram v okolju, da ohranjajo homeostazo. Na encimske biomarkerje lahko tako vplivajo: velikost živali (Xuereb in sod., 2009a), slanost vode (Cailleaud in sod., 2006), temperatura (Cailleaud in sod., 2006; Menezes in sod., 2006; Robillard in sod., 2003; Vidal in sod., 2002), vrednost pH (Robillard in sod., 2003) in medij (Vidal in sod., 2002; Printes in Callaghan, 2003). Na količino založnih snovi lahko vplivajo: količina in izvor hrane (Hervant in sod., 1997; Charron in sod., 2014), letni čas (Sroda in Cossu-Leguille, 2011; Gismondi in sod., 2012), temperatura (Issartel in sod., 2005; Sroda in Cossu-Leguille, 2011; Gismondi in sod., 2012), spol (Sroda in Cossu-Leguille, 2011; Gismondi in sod., 2012), parjenje (Plaistow in sod., 2003; Sparkes in sod., 1996; Jormalainen in sod.; 2001) in količina kisika (Hervant in sod., 1996, 1999).

Vpliv na vrednost biomarkerjev imajo tudi številna onesnažila (Ferreira in sod., 2015; O'Neill in sod., 2004; Xuereb in sod., 2009b; Domingues in sod., 2010; Carvalho in sod., 2013; Dierickx, 1984; Gowland in sod., 2002; Ribeiro in sod., 2001; Stanek in sod., 2006;

Verslycke in sod., 2004; De Coen in Janssen, 1997), vendar ugotavljanje njihovega vpliva ni namen te naloge.

Vodni osliček sicer predstavlja potencialni modelni organizem za biomonitoring, vendar pa zanj še ni znana naravna dinamika vrednosti biomarkerjev, ki so odvisni od okoljskih in endogenih vplivov. Raziskave naravne dinamike biomarkerjev bi pripomogle k presoji primernosti *A. aquaticus* in meritev njegovih biomarkerjev za uporabo v biomonitoringu.

## 1.2 NAMEN RAZISKOVANJA

Magistrsko delo je nastalo z namenom proučevanja sezonske dinamike biomarkerjev pri vodnem osličku, *A. aquaticus* in primerjave biomarkerjev treh različnih podvrst iz jamskih in površinskih lokacij. Merili smo aktivnost dveh encimov (acetilholinesteraze in glutation-S-transferaze) ter merili količino treh založnih snovi (lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov). Želeli smo ugotoviti vpliv sezonsko vezanih okoljskih dejavnikov na biomarkerje pri *A. aquaticus* in ugotoviti ali obstajajo razlike med biomarkerji površinskih in jamskih populacij. Končni cilj naloge je podati smernice za razumevanje bazalnih vrednosti biomarkerjev vodnih osličkov in njihovo potencialno uporabo v biomonitoringu.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- H1: Vrednosti encimskih aktivnosti se razlikujejo med generacijami osebkov, ki so bile nabrane v različnih letnih časih, a na isti lokaciji.
- H2: Količina založnih snovi se razlikuje med generacijami osebkov, ki so bile nabrane v različnih letnih časih, a na isti lokaciji.
- H3: Vrednosti encimskih aktivnosti se pri jamski podvrsti razlikujejo od površinskih podvrst v okviru istega letnega časa.
- H4: Količina založnih snovi se pri jamski podvrsti razlikuje od površinskih podvrst v okviru istega letnega časa.

## 2 PREGLED OBJAV

V nalogi smo proučevali vrednosti izbranih biomarkerjev pri vodnih osličkih, *Asellus aquaticus*, ki smo jih vzorčili na 4 lokacijah v treh letnih časih. V nadaljevanju bomo predstavili značilnosti proučevanega organizma, opisali glavne razlike med površinskimi in jamskimi živalmi, podali definicijo biomarkerja ter opisali biomarkerje, ki smo jih merili v nalogi ter možne vplive okoljskih dejavnikov nanje.

### 2.1 VRSTA *ASELLUS AQUATICUS*

Vodni osliček, *Asellus aquaticus* (Linnaeus, 1758) (Crustacea: Isopoda: Asellota: Asellidae), je evritopa, evritermna in ekspanzivna vrsta. Najdemo ga tako v različnih površinskih sladkovodnih habitatih, kot tudi v podzemnih vodah (Henry in sod., 1996).

Gruner (1965) navaja, da je *A. aquaticus* razširjen v: Norveški, Švedski, Finski, Danski, Veliki Britaniji, Nizozemski, Belgiji, Franciji, Nemčiji, Švici, Avstriji, Italiji, Poljski, Češki, Slovaški, Madžarski, Romuniji, Sloveniji, Hrvaški, Bosni in Hercegovini, Srbiji, Črni Gori, Makedoniji, Albaniji, Grčiji, Turčiji, Iranu, območju Kavkaza in celotnem evropskem delu nekdanje Sovjetske zveze.

Vrsta je prisotna na večini ozemlja nekdanje Jugoslavije, pri čemer je na tem področju znanih več podvrst (Sket, 1994). V našem delu obravnavamo tri podvrste: *A. aquaticus aquaticus* (Slika 1, levo), ki je najbolj razširjena podvrsta, *A. a. carniolicus* Sket, 1965, najbolj pleziomorfno podvrsto, ki živi na kraških poljih v JZ Sloveniji in *A. a. cavernicolus* Racovitza, 1925 (Slika 1, desno), najbolj troglomorfno podvrsto, ki je znana iz podzemnih delov reke Pivke in Ljubljanice (Prevorčnik in sod., 2004).



**Slika 1:** Odrasli vodni osliček površinske podvrste *Asellus aquaticus aquaticus* (levo, na listu črne jelše) in jamske podvrste *A. a. cavernicolus* (desno). Foto: Ž. Fišer.

Vodni oslički pred kopulacijo tvorijo t.i. prekopule, kar pomeni, da samec drži samico z nogami in jo prenaša pod seboj, dokler ona ne levi zadnje polovice telesa. Šele tedaj jo samec lahko oplodi, samica pa odloži oplojena jajca v valilnik (Ridley in Thompson, 1979). Letno



dinamiko razmnoževanja vodnih osličkov na Ljubljanskem barju opisujeta Štrus in Blejec (1983). Navajata, da razmnoževanje vodnih osličkov traja od marca do oktobra, z dvema vrhuncema: prvim maja ali junija in drugim avgusta ali septembra. V našem podnebjju imajo površinski *A. aquaticus* verjetno tri generacije: spomladansko (ki je prezimila od prejšnje jeseni), poletno (potomci spomladanske) in jesensko (potomci poletne generacije). Slednja je generacija, ki prezimi do naslednje pomladi (Štrus in Blejec, 1983; Steel, 1961). Ker razmnoževanje poteka od začetka pomladi do jeseni, se poletna in jesenska generacija med seboj mešata (Štrus in Blejec, 1983), generacija, ki je prezimila od lanskega leta pa do začetka poletja pogine (Steel, 1961). Na severu Evrope se vodni oslički pariyo le dva meseca v letu (Andersson, 1969), na jugu Evrope, kjer mile zime ne predstavljajo ovire za razmnoževanje, se lahko razmnožujejo tudi pozimi (Migliore in sod., 1982). Štrus in Blejec (1983) navajata, da so samice največje v zimskih in zgodnjih pomladnih mesecih. Tudi Steel (1961) ter Ridley in Thompson (1979) poročajo, da so vodni oslički največji od decembra do aprila, od konca pomladi naprej pa so živali manjše od 9 mm. Za jamske populacije podatkov o razmnoževanju in generativnem času ni. Več avtorjev navaja, da površinske populacije regulirajo razmnoževanje glede na fotoperiodo in temperaturo vode (Štrus in Blejec, 1983; Økland, 1978; Andersson, 1969).

*A. aquaticus* živi v počasnejših nižinskih vodotokih in stoječih vodah, prisoten je tako v čistejših vodah kot tudi v okolju z višjo stopnjo saprobnosti in večjo količino hranil v vodi (Parvulescu, 2009). V slednjem se pojavlja v večjem številu, vendar so osebki manjši, kot v čistih vodah (Tolba in Holdich, 1981). Odmrlo rastlinje v vodnih telesih, ki je primarna hrana vodnega oslička (Graca in sod., 1994; Prus, 1971), je ponavadi obrastla z mikroorganizmi, ki prispevajo k prehranski vrednosti detrita, tako z lastno biomaso, kot z deloma »prebavljeno«  
organsko snovjo, na kateri živijo (Cummins, 1979). Prehranjuje se tudi z zelenimi rastlinami in algami (Marcus in sod. 1978). *A. aquaticus* je pomemben plen za mnoge ribe (Rask in Hiisivuori, 1985) in predatorske nevretenčarje (Cockrell, 1984; MacNeil in sod. 2002).

*A. aquaticus* je izjemno odporen na hipoksijo, saj tolerira količine raztopljenega O<sub>2</sub> do 1,5 mg/l in uspešno živi v vodah s koncentracijo O<sub>2</sub> 5,8 mg/l. (Holland, 1976). Glede na ekološko nišo je drobilec, kar pomeni, da se prehranjuje z detritom oz. grobimi delci organske snovi. Z oddaljevanjem od izvira in z zviševanjem biokemične porabe kisika (BPK) se razmerje med rodом *Asellus* in drugimi drobilci (npr. postranicami iz rodu *Gammarus*) zvišuje, saj je prvi odporen na organsko onesnaženje in nižje količine kisika za razliko od postranic, ki zasedajo podobno ekološko nišo (MacNeil, 2002). Slednje plenijo vodnega oslička (predvsem juvenilne osebke), kar delno razloži nižje razmerje med rodovoma v čistejših vodah (MacNeil, 2002). Toleranca na koncentracijo NH<sub>3</sub> se pri vrsti spreminja glede na letni čas vzorčenja osebkov ter je obratno sorazmerna s temperaturo vode. Lahko je 5-krat (v zimskem času) do 15-krat (v poletnem času) višja od vrst iz rodu *Gammarus* (Dehedin, 2013). *A. aquaticus* je odporen tudi na termični stres; z zviševanjem temperature se količina porabe O<sub>2</sub> ne poveča (Dehedin, 2013). Možno je, da NH<sub>3</sub> moti vnos

O<sub>2</sub> v organizem, kar je pri višjih temperaturah bolj problematično, saj se zmanjša količina raztopljenega kisika (Dehedin, 2013). Vrste iz rodu *Gammarus* imajo različno porabo O<sub>2</sub> glede na temperaturo, *A. aquaticus* pa vedno nižjo porabo O<sub>2</sub> od njih (Dehedin, 2013).

Vodni oslički so pomemben člen v prehranskih spletih, zato so tudi pomembni modelni organizmi za raziskave v vodni ekologiji (Hasu in sod., 2008), ekotoksikologiji (Migliore in sod., 1990; Bouskill in sod., 2006; Lukančič in sod., 2010; Bloor in sod., 2005; De Lange in sod., 2008) ter evolucijski in razvojni biologiji (Protas in Jeffery, 2012; Stahl in sod., 2015).

## 2.2 PRIMERJAVA PODZEMNIH IN POVRŠINSKIH ŽIVALI

Podzemne populacije *A. aquaticus* lahko najdemo v Sloveniji, Italiji in Romuniji (Verovnik in sod., 2009). Med površinskimi in podzemnimi populacijami je več morfoloških razlik: podzemne živali so pogosto večje, nekatere okončine so daljše, imajo manj ali nič pigmenta v telesu in očeh ter manjše ali nerazvite oči (Turk in sod., 1996; Prevorčnik in sod., 2004).

Lattinger-Penko (1979) poroča, da je podzemni *A. a. cavernicolus* iz Postojnsko-planinskega jamskega sistema po trajanju levitve in času med levitvami, dolžini kopulacije in številu potomcev, bolj podoben površinskemu *A. a. aquaticus*, kot nekaterim podzemnim vrstam enakonožnih rakov (*Proasellus cavaticus*, *Caecosphaeroma burgundum*, *Angelierea phreaticola*).

### 2.2.1 Razlike med prilagoditvami podzemnih in površinskih rakov

Razmere v jamah se od površinskih pogosto razlikujejo po pomanjkanju hrane in njenem nerednem alohtonem vnosu ter daljših obdobjih hipoksije (Hervant in sod., 1997; Mathieu in Hervant, 2004). Več avtorjev navaja, da imajo podzemni raki nižjo stopnjo metabolizma kot njim sorodne površinske vrste (delo na *Gammarus fossarum*, *Gammarus troglophilus*, *Gammarus acherondytes*, *Niphargus stygius* in *Niphargus rhenorhodanensis*) (Hervant in sod., 1997; Simčič in sod., 2005; Simčič in Brancelj, 2007; Wilhelm in sod., 2006). Po drugi strani pa Culver in Poulson (1971) poročata, da se stopnja metabolizma treh ekotipov *Gammarus minus* (enega jamskega in dveh površinskih) ne razlikuje od stopnje metabolizma dveh ekotipov sorodnega rodu *Stygonectes* (jamskega in površinskega), ker ni bilo razlik v količini hrane med površinskimi in jamskimi habitati.

Hervant in sod. (1997) so primerjali odzive treh podzemnih vrst rakov (*N. rhenorhodanensis*, *N. virei* in *Stenasellus virei*) in dveh površinskih vrst rakov (*G. fossarum* in *A. aquaticus*) na stradanje. Površinski vrsti sta se odzvali s periodo hiperaktivnosti (kar ustreza iskanju hrane), ki ji je sledil upad aktivnosti, medtem ko so podzemne vrste aktivnost zmanjševale postopoma, respiracijo in porabo kisika so znižale bistveno bolj od površinskih vrst. Prav tako so podzemne vrste preživele brez hrane skoraj trikrat dlje in so nov vir hrane hitreje izkoristile od površinskih vrst. O podobni strategiji za premostitev pomanjkanja hrane poročajo tudi pri človeški ribici (*Proteus anguinus*) (Hervant in sod., 2001).

Podzemni raki, ki so morfološko podobni površinskim, imajo lahko med stradanjem drugačno dinamiko izrabe založnih snovi kot površinske vrste. Hervant in Renault (2002) poročata, da so se površinski *A. aquaticus* na stradanje odzvali z velikim upadom vseh treh vrst založnih snovi (lipidov, ogljikovih hidratov, proteinov). Medtem so se osebkii podzemne vrste enakonožnega raka *S. virei* odzvali v treh fazah, med katerimi so pretežno porabljali različne založne snovi: fosfageno-glucidno fazo (v večji meri poraba arginin fosfata in glikogena), lipidno fazo (v večji meri poraba lipidov) in nazadnje proteo-lipidno fazo (v večji meri poraba proteinov in lipidov). Po ponovnem hranjenju so podzemni raki mnogo hitreje nadomestili založne snovi, izgubljene med stradanjem, kot površinski.

## 2.3 BIOMARKERJI KOT POKAZATELJI FIZIOLOŠKEGA STANJA

### 2.3.1 Opredelitev biomarkerjev

Pojem biomarker Van Gestel in Van Brummelen (1996) definirata glede na nivo biološke organizacije. Biomarker opisujeta kot katerikoli biološki odziv na onesnažilo, ki ga izmerimo na ravni nižji od osebkov. Označuje torej parameter, ki ga izmerimo v osebkov in nakazuje odstopanje od bazalnega stanja, vendar izključuje parametre na nivoju organizma (kot npr. umrljivost, aktivnost, prehranjevanje). Tako omejujeta pojem biomarker na biokemične, fiziološke, histološke in morfološke parametre in izločata vedenjske indikatorje.

### 2.3.2 Uporabnost biomarkerjev v biomonitoringu

Malo več kot pred desetletjem so Handy in sod. (2003) predlagali, da lahko meritev biomarkerjev nadomesti neposredno meritev onesnaževal in, da je biomarker ustrezen kazalec izpostavljenosti in učinka, kadar koncentracija onesnaževala v okolju sorazmerno vpliva na odziv biomarkerja. Več avtorjev je meritvi biomarkerjev pripisovala velik potencial kot orodju za zaznavanje onesnaženja preko meritve encimskih aktivnosti (Ferreira in sod., 2015; Carvalho in sod., 2013; Handy in sod., 2003) ali količine založnih snovi (Donker, 1992; Ribeiro in sod., 2001, Schill in Köhler, 2004; Smolders in sod., 2004; Durou in sod., 2005). Handy in sod. (2003) so navedli tudi štiri razloge, zaradi katerih je uporaba biomarkerjev boljša od meritve količine posameznih onesnaževal v okolju:

- i. Biomarkerji naj bi nakazovali prisotnost biološko aktivne substance,
- ii. Uporaba biomarkerjev naj bi pokazala prisotnost onesnaževal, na katere se sprva ni sumilo,
- iii. Odzivi biomarkerjev naj bi trajali dalj časa po izpostavitvi. Tako lahko zaznamo izpostavljenost tudi, če kemični monitoring nek dogodek zgreši,
- iv. Analize biomarkerjev naj bi bile v mnogih primerih cenejše in lažje kot širok spekter kemičnih analiz.

Kljub začetnim obetom uporabe biomarkerjev in številnim raziskavam, se ti ne uporabljajo pogosto v oceni tveganja za okolje (angl. environmental risk assessment) in za reguliranje izpustov (Handy in sod., 2003; Jemec in sod., 2010). Po mnenju Jemec in sod. (2010) bi bili biomarkerji najprimernejši predvsem za študij vplivov učinkov na organizme in ne pri rutinski oceni tveganja.

Zaradi nepoznavanja dinamike biomarkerjev v naravi (Jemec in sod., 2010), nejasnih zvez med odmerki onesnažil in vrednostmi biomarkerjev ter neznane povezave s fitnessom živali (Forbes in sod., 2006), biomarkerji zaenkrat niso uporabni za ekstrapolacijo učinkov iz osebkov na populacije, združbe ali ekosisteme (Van Gestel in Van Brummelen, 1996). Kljub temu pa obstajajo študije, ki se ukvarjajo s povezavami med vrednostmi biomarkerjev in

nekaterimi histopatološkimi spremembami (Jemec in sod., 2012) ter spremembami na nivoju populacij (De Coen in Janssen, 2003; Durou in sod., 2007; Koop in sod., 2008).

## 2.4 PROUČEVANI BIOMARKERJI

V nadaljevanju predstavljamo biomarkerje, ki smo jih v tem delu proučevali: aktivnost acetilholinesteraze (AChE), aktivnost glutation-S-transferaze (GST) in založne snovi (lipidi, ogljikovi hidrati, proteini).

### 2.4.1 Aktivnost AChE

Acetilholinesteraza je encim, ki je odgovoren za pravilen prenos živčnih signalov. Akcijski potencial na presinaptičnem nevronu povzroči odprtje  $\text{Ca}^{2+}$  kanalov, zaradi česar pride do eksocitoze živčnega prenašalca (v tem primeru acetilholina). Ta difundira čez sinaptično špranjo in se veže na receptorje na postsinaptičnem nevronu. Vezava povzroči razliko v prevodnosti membrane za ione, kar lahko povzroči akcijski potencial na naslednjem nevronu. Da se lahko prenese nov signal je potrebna odstranitev acetilholina, ki ga acetilholinesteraza s hidrolizo odstrani iz sinaptične špranje med nevronoma (Purves in sod., 2004). V nevretenčarjih je vloga AChE manj jasna. Raki imajo inhibitorne in ekscitatorne motorične nevrone, ki uporabljajo druge živčne prenašalce, acetilholin pa je živčni prenašalec predvsem v aferentnih živčnih vlaknih (Fulton in Key, 2001).

Med aktivnostjo AChE in lokomotorno aktivnostjo živali je direktna povezava znana pri rakah (Xuereb in sod., 2009b, Engenheiro in sod., 2005) in šesteronožcih (Jensen in sod., 1997). Poleg tega ima AChE v različnih nevretenčarjih vrsto drugih vlog (Karczmar, 2010), vendar v rakah te zaenkrat niso opisane. Raziskave kažejo, da ima AChE vlogo pri oploditvi jajčnih celic morskih ježkov (Angelini in sod., 2004), pri razvoju in regeneraciji tkiva lovč hobotnic *Octopus vulgaris* (Fossati in sod., 2015) in pri reprodukciji, razvoju zarodka in rasti potomcev hrošča *Tribolium castaneum* (Lu in sod., 2012).

Znano je, da aktivnost AChE zavirajo nekateri insekticidi, kar povzroči nepravilno delovanje živčnega sistema. Reakcija je ireverzibilna za mnoge pesticide in tudi po daljšem času, ko se pesticid izloči iz telesa živali, je možno zaznati nižjo aktivnost AChE (Hyne in Maher, 2003; Domingues in sod., 2010). Zaradi njenega indikatorskega potenciala za ugotavljanje onesnaženosti okolja, aktivnost AChE proučujejo kot pokazatelj vpliva organofosfatnih in karbamatnih pesticidov na organizme (Hyne in Maher, 2003; Fulton in Key, 2001; Day in sod., 1990; Carvalho, 2013; Domingues in sod., 2010).

### 2.4.2 Aktivnost GST

Glutation S-transferaze so skupina encimov, ki katalizirajo konjugacijo organskih molekul z reaktivnim elektrofilnim centrom s tiolno skupino tripeptida glutationa. Reakcija povzroči, da se reaktivna lipofilna molekula spremeni v vodotopen in nereaktiven metabolit, ki ga

organizem zlahka izloči (Clark, 1989). Encimi v skupini so specifični za različne vrste molekul: alkil- in arilhalide, karboksilate, sufatne in fosfatne estre, epoksidge, organske nitrata, tiocianate in hidroperoksidge (Habig in sod. 1974; Clark, 1989). Druga pomembna vloga je antioksidativna. Encimi GST na glutation vežejo tudi hidroperoksidaze in citotoksične aldehide, ki nastanejo tekom lipidne peroksidacije, tj. oksidacije membranskih lipidov (Halliwell in Gutteridge, 2015; Wallace in sod., 1997).

Encimi GST so prisotni v večini organizmov, v bakterijah, rastlinah, glivah in živalih. Glede na taksonomski položaj organizma je nemogoče določiti, kakšna bo aktivnost GST, saj se vrednosti med taksoni zelo razlikujejo. Zelo se razlikujejo tudi odzivi različnih organizmov na posamezna onesnaževala. V živalih se encimi GST pojavljajo v večjih količinah v genitalijah, v tkivih, ki so izpostavljena okoljskim vplivom (škrpah, črevesju, kutikuli, izločevalnih organih) in v tkivih, ki so analogna vretenčarskim jetrom (maščobno telo žuželk, hepatopankreas mehkužcev in rakov) (Clark, 1989).

Aktivnost GST proučujejo v ekotoksikoloških študijah zaradi biomarkerskega potenciala za ugotavljanje onesnaženja okolja, saj povišana aktivnost GST nakazuje procese razstrupljanja (Jemec in sod., 2007).

### **2.4.3 Založne snovi**

Lipidi, ogljikovi hidrati in proteini so snovi, ki jih živi organizmi proizvajajo za različne namene. V magistrskem delu smo se osredotočili predvsem na njihovo funkcijo kot založne snovi, saj lahko raki vse tri tipe snovi uporabljajo kot založne snovi (Sanchez-Paz in sod., 2006).

Lipidi so nepolarne organske molekule, ki jih iz organizmov lahko ekstrahiramo z organskimi topili. Maščobe, olja, voski, v maščobah topni vitamini, steroli in fosfolipidi celičnih membran so nekateri primeri lipidov. Živalske maščobe in rastlinska olja so najpogostejši lipidi. Kemično jih opredelimo kot trigliceride. Živali uporabljajo lipide kot dolgoročne založne snovi, ker so manj oksidirani od ogljikovih hidratov in preskrbijo žival s 6-krat več energije kot enaka količina hidriranega glikogena (McMurry, 2016).

Ogljikovi hidrati zajemajo spojine, ki so polihidroksialdehidi in polihidroksiketoni. Ločujemo jih na enostavne in kompleksne, glede na to ali gre za posamezne molekule ali polimere. Organizmi jih uporabljajo npr. kot gradnike celic in DNK ter za pridobivanje energije in založne snovi. Primeri založnih snovi v živih organizmih vključujejo glukozo, fruktozo, škrob in glikogen. Ogljikovi hidrati živalim predstavljajo vir energije in založno snov, ki jo lahko hitreje mobilizirajo kot maščobe (McMurry, 2016).

Proteini so polimeri aminokislin, ki so v verige povezane s peptidnimi vezmi. Pojavljajo se v vseh organizmih in opravljajo zelo različne biološke funkcije, kljub temu pa je njihova osnovna struktura zelo podobna. V grobem lahko delimo proteine na globularne in fibrilarne.

Fibrilarni proteini so čvrsti in večinoma v vodi netopni (npr. keratin v lasih in nohtih, fibroin v svili), medtem ko so mnogi globularni proteini v vodi topni (npr. miogloblin, okoli 50 000 encimov v človeškem telesu) (McMurry, 2016).

## 2.5 VPLIV OKOLJSKIH DEJAVNIKOV NA BIOMARKERJE

Več avtorjev poroča, da je za uspešno uporabo biomarkerjev za zaznavanje onesnažil potrebno poznavanje okoljskih dejavnikov na biomarkerje in naravno dinamiko biomarkerjev (Jemec in sod., 2010; Xuereb in sod., 2009a; Handy in sod., 2003; Domingues in sod., 2010; Van Gestel in Van Brummelen, 1996). Samo tako so biomarkerji lahko zanesljivi pokazatelji stanja v naravi.

Na biomarkerje, ki jih obravnavamo v magistrskem delu, lahko vplivajo številni okoljski dejavniki (letni čas, temperatura, razvojni stadij živali, spol, razpoložljivost hrane, snovi v okolju, itd.) (Jemec in sod., 2010). Samo s poznavanjem teh vplivov lahko zanesljivo ocenimo kaj je v danem času in okolju »bazalna« vrednost biomarkerjev, ki jih proučujemo.

### 2.5.1 Vplivi na aktivnost AChE

Na aktivnost AChE lahko vpliva več okoljskih dejavnikov, zato je razumevanje teh ključno za tolmačenje vpliva pesticidov na organizme in okolje. Številne raziskave zato obravnavajo vpliv različnih okoljskih dejavnikov.

Encimska aktivnost se med taksoni lahko močno razlikuje. Berra in sod. (2004) so merili aktivnost AChE in GST različnih nevretenčarjev iz rek Taro in Ticino. Njihove meritve kažejo, da se znotraj sezone med taksoni aktivnosti AChE razlikujejo, poleg tega pa poročajo tudi o sezonskih nihanjih, ki se med taksoni in encimoma razlikujejo. Olsen in sod. (2001) poročajo o veliki variabilnosti tudi znotraj vrste pri ličinkah dvokrilca *Chironomus riparius*. Živalim, vzorčenim iz različnih lokacij, so izmerili značilno različne aktivnosti AChE, čeprav so bile lokacije neonesnažene in niso zaznali povezave z izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri.

Pri nekaterih vrstah lahko na aktivnost AChE vpliva tudi velikost oz. razvojno stanje osebkov v raziskavi (Domingues in sod., 2010). Manjšim, juvenilnim osebkom *Gammarus fossarum* so izmerili značilno višjo aktivnost kot odraslim (Xuereb in sod., 2009a). Ribeiro in sod. (1999) pa nasprotno poročajo, da imajo juvenilni osebki enakonožnega raka *Porcelio dilatatus* značilno nižjo aktivnost od odraslih. V morski školjki *Macoma balthica* aktivnost AChE korelira z maso noge (Leinio in sod., 2005).

Tako Xuereb in sod. (2009a) kot tudi Ribeiro in sod. (1999) in Forget in sod. (2003), niso ugotovili vpliva spola na aktivnost AChE (delo na *G. fossarum*, *P. dilatatus* in *Tigriopus brevicornis*).

V mnogih primerih je povišanje temperature v okolju povezano z letnim časom, zato navajamo podatke o vplivu letnega časa in temperature skupaj. Pri vrsti *Eurytemora affinis*, ceponožcu ki živi v estuarijih, je imela temperatura vode v manjši meri vpliv na aktivnost AChE (Cailleaud in sod., 2006). Menezes in sod. (2006) pri kozici *Crangon crangon* poročajo o značilnem vplivu temperature na aktivnost AChE, ki je bila pri 9 °C nižja, kot pri višjih temperaturah. Pri vrsti sladkovodne školjke *Anodonta cygnea* je nihanje aktivnosti AChE povezano z nihanjem temperature (Robillard in sod., 2003), podobno pa velja tudi za sladkovodno školjko *Corbicula fluminea*, kjer je nižja temperatura povzročila nižjo aktivnost propionilholinesteraze (Vidal in sod., 2002). Xuereb in sod. (2009a) vpliva temperature ali sezone na aktivnost AChE pri *G. fossarum* niso ugotovili.

Medtem ko Cailleaud in sod. (2006) ugotavljajo vpliv slanosti pri *E. affinis*, ga Menezes in sod. (2006) pri *C. crangon* niso opazili. Robillard in sod. (2003) navajajo vpliv nihanja pH pri *A. cygnea*. Vidal in sod. (2002) poročajo, da je padec aktivnosti propionilholinesteraze pri *C. fluminea* povzročila odsotnost peska v substratu.

Poleg abiotskih dejavnikov študije poročajo o tem, da na AChE vplivajo tudi onesnaževala. O'Neill in sod. (2004) poročajo o upadu aktivnosti holinesteraz v *A. aquaticus* na lokacijah dolvodno od pritoka odpadnih vod iz čistilne naprave. *G. fossarum*, izpostavljeni klorpirifosu in metomilu, so imeli nižjo aktivnost AChE, kar je povzročilo zmanjšanje njihovega hranjenja ter premikanja, čeprav ti dve snovi inhibirata AChE na različen način (Xuereb in sod., 2009b). Podobno poročajo Jensen in sod. (1997), ki so hrošče *Pterostichus cupreus* izpostavili insekticidu dimetoatu; po izpostavljenosti se jim je znižala aktivnost AChE, s čimer je koreliralo zmanjšanje lokomotorne aktivnosti. Stanek in sod. (2003) poročajo o nižjih aktivnostih AChE pri izopodnih rakih *Porcellionides pruinosus*, ki so bili izpostavljeni diazinonu. Vendar onesnažila ne vplivajo na vse živali enako – Jemec in sod. (2007) navajajo, da izpostavljenost diazinonu, Cr<sup>6+</sup> in Cd<sup>2+</sup> ne povzroči znižanja aktivnosti AChE v *D. magna*.

Day in sod. (1990) so testirali vpliv pesticidov azinfosmetila, fenitrotona in klorpirifosa. Različne vrste vodnih nevretenčarjev so se razlikovale v odzivu na pesticide. Na prva dva pesticida se živali večinoma niso odzvale z zmanjšanjem aktivnosti AChE, z izjemo postranice *Hyalella azteca*, kateri je po 24-urni izpostavitvi aktivnost padla za 55%. Odziv na klorpirifos je bilo 30.7–45.1% zmanjšanje pri vrbnici *Claassenia* sp., vendar pri koncentracijah, ki so bile že blizu letalnim. Izsledki njihovih raziskav so bili, da uporabljeni pesticidi niso toksični pri običajno uporabljenih koncentracijah ali, da se aktivnost AChE ne zmanjša pri subletalnih koncentracijah pesticidov.

Na aktivnost AChE lahko vpliva vrsta okoljskih dejavnikov, a kaže, da so ti vplivi lahko zelo vrstno specifični.



## 2.5.2 Vplivi na aktivnost GST

Tudi encimi GST so podvrženi različnim okoljskim dejavnikom, razumevanje katerih je ključnega pomena za pravilno interpretacijo izmerjenih vrednosti GST v organizmih.

Aktivnost GST je neposredno povezana z metabolno aktivnostjo organizma, ker reaktivne kisikove spojine (angl. reactive oxygen species, ROS) nastajajo kot stranski produkt v elektronski transportni verigi v mitohondrijih. Tako višja temperatura ali pa višja količina kisika povzroči nastanek več ROS, zaradi česar lahko pričakujemo višjo aktivnost GST (Lushchak, 2011).

Zgoraj omenjeni Berra in sod. (2004) so tudi za aktivnost GST ugotovili razlike med taksoni znotraj sezone. Dierickx (1984) navaja aktivnosti GST za 20 vrst vodnih nevretenčarjev v različnih razvojnih fazah, med njimi tudi za odrasle *A. aquaticus*. Navaja tudi do 6-kratne razlike v encimskih aktivnostih med taksoni. Olsen in sod. (2001) poročajo o variabilnosti znotraj vrste pri larvah *Chironomus riparius* tudi za GST. Živalim, vzorčenim na različnih lokacijah, so izmerili značilno različne aktivnosti GST, kljub temu da so bile lokacije neonesnažene in niso zaznali povezave z izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri. Med vrstami postranic *Pallasea cancelloides*, *Eulimnogammarus verrucosus* in *Gammarus lacustris* so bile majhne razlike v aktivnosti GST, značilne razlike glede na velikostni razred živali pa ni bilo (Timofeyev, 2006).

Berra in sod. (2004) navajajo sezonska nihanja, ki se med različnimi taksoni nevretenčarjev razlikujejo. Cailleaud in sod. (2006) pri zgoraj omenjenem ceponožcu *E. affinis* poročajo o majhnem vplivu temperature ter o vplivu slanosti na aktivnost GST. Užitna klapavica, *Mytilus galloprovincialis*, kaže sezonsko nihanje aktivnosti GST, vendar ta ni statistično značilna zaradi velike variance (Bocchetti in sod., 2006). Menezes in sod. (2006) ne poročajo o značilnih učinkih temperature na aktivnost GST pri kozici *C. crangon*.

Cailleaud in sod. (2006) za ceponožnega raka vrste *E. affinis*, ki živi v estuarijih, poročajo o vplivu slanosti. Menezes in sod. (2006) pa ne navajajo vpliva slanosti ali transporta živali na aktivnost GST pri kozici *C. crangon*. Pri morski školjki *Mytilus edulis* na aktivnost GST vpliva predvsem Secchi-jeva globina, pri *M. balthica* pa predvsem nasičenost vode na dnu s kisikom, na biomarkerje obeh vrst pa verjetno vpliva tudi variabilnost temperature in razpoložljivost hrane (Leinio in Lehtonen, 2005).

Vpliv na aktivnost GST imajo lahko tudi onesnažila, vendar je ta odvisen od vrste snovi in njene koncentracije. Testi inhibicije z različnimi ksenobiotiki kažejo na različno kapaciteto kemikalij za inhibicijo GST (od največje do najmanjše kapacitete za inhibicijo: *o*-kloranil > kinoni > klorofenoksialkilne kisline) (Dierickx, 1984). Jemec in sod. (2008) poročajo, da nanodelci titanovega dioksida zmanjšajo aktivnost GST v enakonožnem raku *P. scaber*, vendar niso odkrili jasnega odnosa med odmerkom in odzivom. Drobne in sod. (2008) poročajo, da v določenih koncentracijah imidakloprid inducira aktivnost GST pri juvenilnih

osebkih *P. scaber* in jo inhibira pri odraslih. V navadni rakovici, *Carcinus maenas* izpostavljenost pesticidu cipermetrinu inducira povišanje aktivnosti GST, ki pade na bazalno raven po 36 urah (Gowland in sod., 2002). Jemec in sod. (2007) pri *D. magna*, izpostavljeni diazinonu ter ionom  $\text{Cr}^{6+}$  in  $\text{Cd}^{2+}$ , niso zaznali učinka na aktivnost GST.

Na aktivnost GST vplivajo številni okoljski dejavniki, katerih vpliv je v večini primerov odvisen od vrste. Na splošno kaže, da ima lahko vpliv temperatura, vendar lahko vplivajo tudi drugi naravni in antropogeni okoljski dejavniki.

### 2.5.3 Vplivi na količino založnih snovi

Poraba energetskih sredstev organizma je dinamičen fiziološki proces, ki je odvisen od vrste (Sanchez-Paz, 2006), okoljskih pogojev (Verslycke in sod., 2002; Ribeiro in sod., 2001) in življenjskega cikla organizma (Nogueira in sod., 2004). Po hipotezi "metabolic cost" izpostavljenost okoljskemu stresu povzroči spremembe v metabolizmu, ki povzročijo večjo porabo založnih snovi. Manjša količina založnih snovi se lahko odraža v manjši rasti organizma in manjšem številu potomcev (Calow in Sibly, 1990; de Coen in Janssen, 1997). Razmnoževanje in rast sta odvisna od prehranskih razmer in se med stradanjem živali lahko ustavita (Nogueira in sod., 2004). Razlike med laboratorijskimi in poskusi v naravi kažejo, da je količina založnih snovi v živali pogojena z okoljskimi dejavniki v večji meri kot z onesnaževali (Smolders in sod., 2004). Meritve založnih snovi so tako lahko biomarker fitnesa živali, vendar zelo nespecifičen, saj lahko stres povzroča veliko dejavnikov (De Coen in Janssen, 1997).

Postranice vrste *Gammarus roeseli* imajo najvišjo vsebnost lipidov in proteinov pozimi in najmanjšo poleti (Sroda in Cossu-Leguille, 2011). Tudi Gismondi in sod. (2012) za vrsto *G. roeseli* ugotavljajo enak trend za lipide in glikogen – najvišje nivoje založnih snovi so izmerili jeseni in pozimi ter najnižji nivo spomladi in poleti. Sezonsko variabilnost razlagajo z razpoložljivostjo hrane ter razmnoževanjem v povezavi s temperaturo – jeseni imajo postranice največ hrane zaradi odpadanja listov, spomladi in poleti pa mobilizirajo založne snovi za razmnoževanje (Gismondi in sod., 2012; Sroda in Cossu-Leguille, 2011). Dutra in sod. (2007) so proučevali sezonsko variabilnost založnih snovi pri dveh simpatričnih vrstah postranic v Braziliji, *Hyaella pleoacuta* in *H. castroi*. Njihove meritve kažejo, da količina založnih snovi v teh dveh vrstah prav tako niha glede na okoljske dejavnike kot so temperatura vode, količina kisika in razpoložljivost hrane. Med vrstama so bile prisotne razlike v založnih snoveh, razlikoval se je tudi vzorec sezonskega nihanja, ki je verjetno povezan z ekološko nišo vrste.

Tako Sroda in Cossu-Leguille (2011) kot tudi Gismondi in sod. (2012) in Dutra in sod. (2007) ugotavljajo, da imajo samice postranic višjo količino založnih snovi kot samci. Charron in sod. (2014) navajajo vpliv spola in življenjskega cikla na količino založnih snovi pri *G. fossarum*. Poročajo, da je pri samcih količina vseh treh založnih snovi (lipidov, ogljikovih

hidratov, proteinov) stabilnejša, kot pri samicah. Pri slednjih niha glede na cikel levitve, največ založnih snovi pa nakopičijo pred levitvijo oz. potencialno oploditvijo.

Razmnoževanje ima vpliv na količino založnih snovi, saj je lahko energetsko potratno. Plaistow in sod. (2003) za postranico *Gammarus pulex* poročajo, da je količina založnih snovi (lipidov in glikogena) v samcih odvisna od tega ali so v prekopuli ali sami. Samci v prekopuli so namreč imeli značilno višje količine lipidov in glikogena, kot samci, ki niso bili v prekopuli. Razliko razlagajo z domnevo, da samci z manj založnimi snovmi ne morejo trošiti energije za prenašanje samice. Možno je, da imajo nekateri samci nižjo količino založnih snovi, ker so jih potrošili med predhodnim razmnoževanjem. Sparkes in sod. (1996) so primerjali količino založnih snovi (glikogena in lipidov) samcev enakonožnih rakov vrste *Lirceus fontinalis* pred parjenjem in takoj po parjenju. Poročajo, da so imeli samci tik po parjenju nižjo količino glikogena od samcev, ki se niso parili. Ugotovili so tudi, da je nižja raven glikogena verjetno posledica stradanja med prekopulo. Jormalainen in sod. (2001) navajajo, da imajo samice enakonožnega raka *Idotea baltica*, ki se upirajo samcu pri zgodnjem tvorjenju prekopule, nižjo količino glikogena in proizvedejo manjša jajca kot samice, ki niso v prekopuli prezgodaj. Dutra in sod. (2007) poročajo, da postranici *H. pleoacuta* in *H. castroi* porabljajo založne snovi glede na cikel razmnoževanja; v reproduktivni sezoni samice porabijo energijo za skrb za zarod in samci za reproduktivno vedenje. Tako Sroda in Cossu-Leguille (2011) kot tudi Gismondi in sod. (2012) in Dutra in sod. (2007) navajajo vpliv razmnoževanja na količino založnih snovi v živali.

Domnevno živali, ki so izpostavljene onesnaženemu okolju, porabijo veliko energije za izogibanje onesnaževalom, za izločanje in/ali razstrupljanje onesnaževala ali za popravilo patoloških učinkov, namesto da bi jo vlagale v rast in razmnoževanje (Forbes in Calow, 1996). Ribeiro in sod. (2001) poročajo, da imajo enakonožni raki *Porcellio dilatatus*, izpostavljeni parationu, nižjo količino lipidov, glikogena in proteinov, medtem ko imajo živali izpostavljene endosulfanu nižje količine lipidov in glikogena, vendar enako količino proteinov. Enakonožni raki *Porcellio scaber*, izpostavljeni dianizonu, so imeli nižjo količino proteinov, medtem ko količina lipidov in glikogena ni padla (Stanek in sod., 2006). Ob izpostavljenosti kozic vrečark *Neomysis integer* pesticidu klorpirifos, se jim zniža količina založnih snovi (Verslycke in sod., 2004). Izpostavljenost vodne bolhe *Daphnia magna* subletalnim koncentracijam stupenih snovi lindana in živosrebrovega klorida rezultira v nižjih količinah založnih snovi (De Coen in Janssen, 1997).

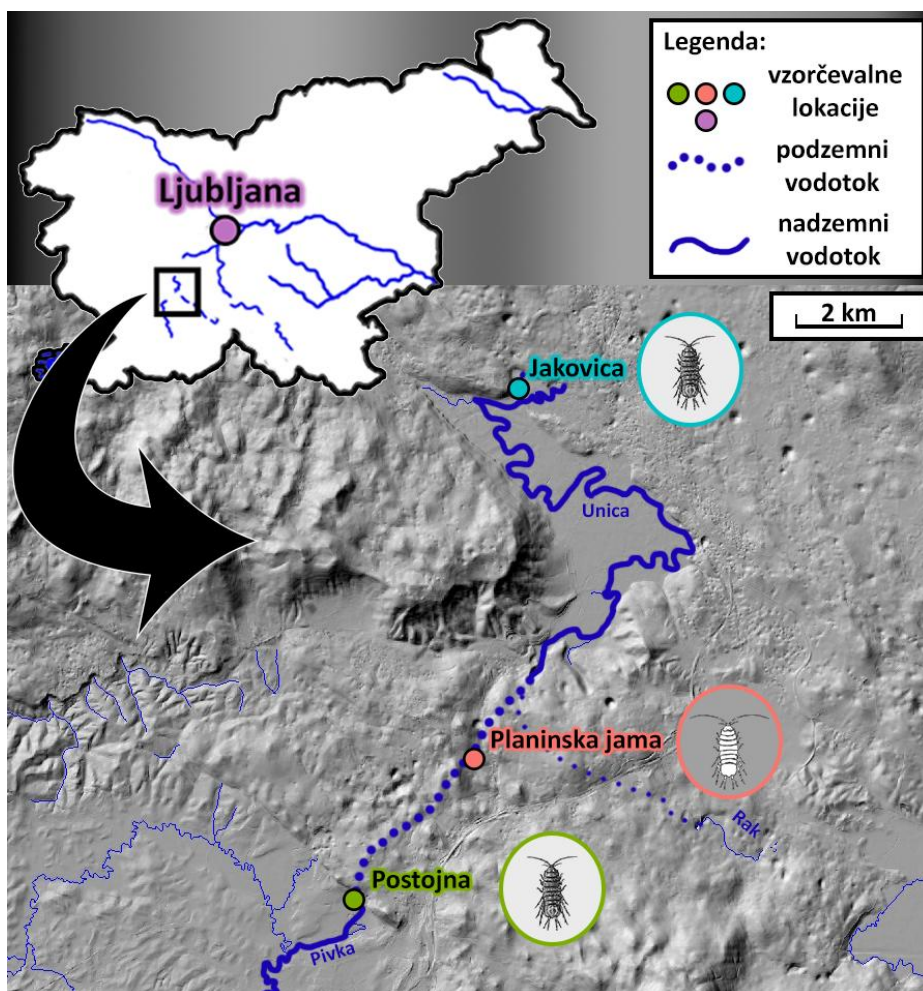
Količina založnih snovi v živalih lahko niha glede na letni čas (ki vpliva na količino hrane, temperaturo), endogene dejavnike (spol, levitev, razmnoževanje) ali človeške dejavnike (onesnažila). Vplivi se lahko razlikujejo glede na proučevano vrsto.

### 3 MATERIAL IN METODE

V tem poglavju opisujemo lokacije, na katerih smo vzorčili vodne osličke, način vzorčenja, postopke, ki smo jih uporabljali v laboratoriju in obdelavo pridobljenih podatkov.

#### 3.1 LOKACIJE

Rake za kvantifikacijo encimske aktivnosti in založnih snovi smo vzorčili na štirih lokacijah. Tri lokacije na Notranjskem smo izbrali zaradi kraškega značaja pokrajine, kjer je habitat tako površinskih populacij kot podzemne podvrste vodnega oslička, *A. aquaticus cavernicolus* (Prevorčnik in sod., 2004). Nahajajo se vzdolž reke Pivke, ki ponikne v Postojnsko jamo in skozi podzemne sifone priteče v Planinsko jamo, v kateri je njeno sotočje z Rakom. Naprej tečeta podzemno kot Unica, po izviru na vhodu Planinske jame pa površinsko po Planinskem polju. Četrta lokacija se nahaja v močvirju na robu Ljubljane in služi kot referenčna lokacija. Prikaz lokacij je viden na Sliki 2.



**Slika 2:** Zemljevid lokacij vzorčenja vodnega oslička. Na shematskem zemljevidu Slovenije je označena Ljubljana in pravokotnik, ki označuje povečan digitalni model reliefa od Postojne do Jakovice (prirejeno po Atlasu voda, ARSO).

### 3.1.1 Opis lokacij

Prva lokacija (Slika 3) je površinski odsek reke Pivke v Postojni, približno 150 m JV od vhoda Postojnske jame, ob parku (GK koordinate; Y 5438520, X 5071085). Desna stran struge, kjer smo vzorčili, je urejena s zidanim kamnitim zidom s stopnicami. Na bregu raste več vrst dreves, med njimi vrbe (*Salix* sp.) in javori (*Acer* sp.). Vodni tok na tej lokaciji je bil v času vzorčenja počasen, velikega nihanja vodne gladine nismo opazili. Vodne osličke smo vzorčili predvsem desno od stopnic, ki so vidne na Sliki 3, kjer je bilo na dnu največ organskega materiala.



**Slika 3:** Lokacija vzorčenja vodnega oslička v reki Pivki, 150 m JV od vhoda v Postojnsko jamo. Foto: D. Škufca.

Druga lokacija se nahaja v Pivškem rokavu v Planinski jami (Slika 4) (GK koordinate vhoda Planinske jame: Y 5441755, X 5075350). Vzorčili smo v kraku podzemeljske Pivke, napolnjenem z vodo, kjer je vodni tok le ob višjem vodostaju. Med našim vzorčenjem toka na tem mestu nismo opazili, vendar je bila voda vedno prisotna. Dno je bilo kamnito in peščeno, grobega organskega materiala je bilo malo.



**Slika 4:** Vhod v Planinsko jamo, iz katere teče Unica (zgoraj, Foto: D. Škufca.) in lokacija vzorčenja *Asellus aquaticus cavernicolus* v Planinski jami (spodaj, Foto: P. Zidar.).

Tretja lokacija (Slika 5) je bila v površinski Unici, približno 850 m SZ od Jakovice (GK koordinate: Y 5441634, X 5080797). Struga reke ni regulirana, vodostaj močno sezonsko niha. V pomladnem času je bil prisoten vodni tok, poleti pa so ostali le večji in manjši bazeni vode. Jeseni je bil vodostaj nekoliko višji kot poleti. Struga je gosto porasla z vodnim rastlinjem, na bregovih rastejo grmičevje in vrbe (*Salix* sp.).



**Slika 5:** Lokacija vzorčenja vodnega oslička v strugi Unice, 850 m SZ od Jakovice na Planinskem polju. Foto: D. Škufca.

Četrta lokacija (Slika 6) je bila v močvirnatem gozdu poleg Oddelka za biologijo v Ljubljani (GK koordinate: Y 5459264, X 5101063). Spomladi in jeseni je bila tu stoječa voda, poleti pa je močvirje presahnilo. Po dnu je bila velika količina odmrlega organskega materiala bližnje vegetacije. Večina dreves so črne jelše (*Alnus glutinosa*), ki v vegetacijski sezoni zasenčijo vodo s svojimi krošnjami. Poleg tega v vodi rastejo šopi helofitov.



**Slika 6:** Lokacija vzorčenja vodnega oslička v močvirnatem gozdu 100 m SZ od Oddelka za biologijo v Ljubljani.

### 3.1.2 Opis vzorčenja

Živali smo vzorčili v treh letnih časih (v oklepajih datumi vzorčenja): spomladi (18. 3. 2015), poleti (17. 6. in 17. 7. 2015) in jeseni (12. 10. in 21. 10. 2015). Pri vsakem vzorčenju smo na vsaki lokaciji povzorčili po 30–40 osebkov, odvisno od njihove številčnosti.

Vodne osličke smo vzorčili s selektivnim vzorčenjem z vodno mrežo in sicer tako, da smo z njo v vodi zamahovali v obliki osmic (oz. znaka za neskončnost). Pri zamahovanju smo pazili, da je bilo ustje mrežice vedno pravokotno na dno ter da je bila ravnina ustja vedno pravokotna na smer gibanja. Prav tako smo bili pozorni, da nismo zamahovali premočno ali prenežno in po gladini, pri čemer se dna nismo dotikali, saj bi s tem zajeli preveč mulja. Na posameznem mestu smo naredili 3–5 zamahov, potem smo se premaknili na naslednje



mesto. Vzorčili smo tudi tam, kjer so bile v vodi rastline, saj se tudi na njih zadržujejo živali. Vzorec smo nato očistili rastlinskega materiala in mulja. Mrežo smo pomočili v vodo, v njej z delov rastlin sprali živali in potem rastline zavržli. Mulj smo sprali s potegi mrežice po vodni gladini. Vzorec smo nato skoncentrirali na dnu mrežice (z roko mečemo vodo in spiramo vzorec na dno ali pa mrežo tapkamo po gladini vode). Dno mrežice smo zgrabili z roko in jo izvihal v banjico z vodo, kjer smo vzorec dodatno očistili ter iz vzorca s pinceto, kapalko ali žličko pobrali odrasle primerne živali. Ob ugodnih razmerah, tj. čisti vodi s šibkim tokom ali brez toka, smo živali lovili tudi direktno s kapalko ali plastično žličko. Zelo majhne živali (manj kot cca. 3 mm) in ovigere samice smo spustili nazaj v vodo in jih nismo zajeli v raziskavah.

Izbrane vodne osličke smo predstavili v banjico s čisto pitno vodo iz plastenke z nevtralnimi pH, kjer smo z njih nežno sprali morebitne delce. Osebkke smo nato predstavili v banjico s papirnatimi brisačami, kjer smo vsakega nežno osušili. To smo storili tako, da smo ga položili med dve plasti papirnatih brisač in nežno pritisnili ob osebkku, nikoli direktno nanj, da ga ne bi poškodovali. Tako je papirnata brisača posesala preostanek vode, ki bi sicer motil meritve sveže mase osebkov. Osušene osebkke smo posamič predstavili v plastično mikrocentrifugirko s pokrovčkom in jo postavili v suhi led, ki sublimira pri temperaturi -78,5 °C. S tem smo žival usmrtili in preprečili nadaljnje celične procese, ki bi vplivali na merjene biomarkerje. Živali smo shranili na suhem ledu do prihoda na Oddelek za biologijo, kjer smo jih do obdelave shranili v zmrzovalniku pri -20 °C.

Pred tem smo na posameznih lokacijah ob vsakem vzorčenju z multimetrom izmerili osnovne fizikalne in kemijske parametre kvalitete vode (temperaturo, pH, koncentracijo kisika in nasičenost s kisikom, prevodnost). Na vsaki lokaciji smo prav tako vzeli vzorec vode za meritve vsebnosti skupne organske snovi (angl. total organic carbon; TOC). Vzorec vode je bil sestavljen iz treh podvorcev po 0,5 l. Vzorce vode smo vzeli pred vzorčenjem z vodno mrežo, saj bi sicer na lokacijah brez toka ali s šibkim tokom v vodni stolpec dvignili mulj in organske delce, ki bi motili meritve. Vodo smo zajeli v plastenke z gladine tako, da ni prišlo do tvorjenja mehurčkov. Plastenke smo zaprli pod gladino vode, da v njih ni bilo zraka. Plastenke smo hranili v hladilni torbi s suhim ledom. Po prihodu na Oddelek za biologijo smo plastenke z vodnim vzorcem zamrzili in do obdelave hranili pri -20 °C.

## 3.2 LABORATORIJSKO DELO

Meritve izbranih biomarkerjev smo izvedli na Oddelku za biologijo. Meritve parametrov vodnih vzorcev so bile izvedene na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

### 3.2.1 Priprava živali za meritve

Osebke smo pred obdelavo odtajali. Med postopkom priprave vzorcev so bili osebki shranjeni na ledu, da bi preprečili razkroj. Najprej smo izmerili njihovo svežo maso na tehtnici Sartorius MC 210 P. Osebkom iz poletnega in jesenskega vzorčevalnega obdobja smo določili tudi spol. To smo storili glede na obliko I. in II. para pleopodov, s pregledom vsakega osebka pod stereolupo.

Na posamezen dan laboratorijskega dela smo v postopkih, opisanih v prihodnjih podpoglavjih, obdelali po 20 osebkov, po 5 s posamezne lokacije. S tem smo preprečili vpliv morebitnih napak znotraj posameznega dneva laboratorijskega dela na vse osebke iz posamezne lokacije. Za vsako vzorčevalno obdobje smo na lokacijo uporabili po 15 osebkov za meritve aktivnosti AChE in GST ter meritve vsebnosti proteinov in po 15 osebkov za meritve vsebnosti lipidov in ogljikovih hidratov. Meritve sveže mase smo tako izvedli na po 30 osebkih iz posamezne lokacije na vzorčevalno obdobje.

### 3.2.2 Priprava supernatanta za merjenje encimske aktivnosti in vsebnosti proteinov

#### 3.2.2.1 Priprava kalij fosfatnega pufera (K-P pufer)

K-P pufer smo pripravili z mešanjem 50 mM raztopin  $K_2HPO_4$  (Sigma) in  $KH_2PO_4$  (Sigma). Med mešanjem smo merili pH in bazi (raztopini  $K_2HPO_4$ ) dodajali kislino (raztopino  $KH_2PO_4$ ), dokler nismo dosegli pH 7. Pufer smo prefiltrirali (filter z velikostjo por 200  $\mu m$ ) in shranili v hladilniku do uporabe. Pred uporabo smo dodali detergent Triton (Sigma), in sicer v koncentraciji 0.5% v/v.

#### 3.2.2.2 Priprava homogenata

Odtajane osebke ( $N = 20$ ) smo homogenizirali v steklenih epruvetah z homogenizatorjem ULTRA-TURRAX IKA T10 basic v 800  $\mu l$  50 mM K-P pufera (pH 7), ki je vseboval 0.5% v/v detergenta Triton (Sigma). Homogenizirali smo 40 sekund na 5. stopnji jakosti, tako da smo epruveto rahlo premikali navzgor in navzdol, vendar je bila konica homogenizatorja vedno potopljena. Med homogenizacijo je bila steklena epruveta potopljena v ledeno kopel, da smo preprečili segrevanje homogenata. Med posameznimi vzorci smo homogenizator dobro sprali z deionizirano vodo ( $dH_2O$ ) in ga obrisali. Po koncu homogeniziranja smo homogenizator dvakrat sprali z  $dH_2O$  in zatem še s 40% etanolom (EtOH).

### 3.2.2.3 Priprava supernatanta

Homogenat smo prenesli v mikrocentrifugirke in ga 15 min centrifugirali na 16 000 g pri 4 °C. Dobljeni supernatant smo odpipetirali in ga uporabili kot vzorec za meritve aktivnosti AChE in GST ter meritve vsebnosti proteinov. Tako smo dobili podatek za vse tri parametre iz posameznega osebka. Vsi trije parametri so bili izmerjeni na isti dan. Supernatant smo do uporabe hranili na ledu.

## 3.2.3 Določanje aktivnosti AChE

Aktivnost AChE smo določili po metodi Ellman in sod. (1961), prilagojeni za mikrotitrne plošče (Jemec in sod., 2007). Pri tej metodi smo za substrat uporabili acetiltioholinklorid (ATChCl, Sigma), ki so ga encimi acetilholinesteraze v homogenatu hidrolizirali v tioholin in acetat. Za obarvanje smo uporabili Ellmanov reagent, ki je raztopina 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoata in natrijevega hidrogenkarbonata. Ta je reagiral s tioholinom, s čimer je nastal anion 5-tio-2-nitro-benzojske kisline, ki je rumene barve. Reakcija je dovolj hitra, da ni omejujoč faktor pri merjenju encimske aktivnosti, prav tako reagenti v uporabljenih koncentracijah ne inhibirajo encimske hidrolize (Ellman in sod., 1961).

### 3.2.3.1 Ellmanov reagent

Za pripravo 1 L Ellmanovega reagenta smo odtehtali 91 mg 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoata (Sigma) in 37.5 mg natrijevega hidrogenkarbonata (Sigma), dodali 100 ml 250 mM K-P pufra in dolili dH<sub>2</sub>O do oznake 1 l ter raztopili kemikalije z stresanjem. Ellmanov reagent smo do uporabe shranili v stekleni posodi, oviti v aluminijevo folijo (zaradi zaščite pred svetlobo), v hladilniku.

### 3.2.3.2 Raztopina ATChCl (1M)

Pripravili smo 1 M raztopino acetiltioholinklorida (ATChCl) tako, da smo v 1 ml sterilizirane bideionizirane H<sub>2</sub>O raztopili 197.33 mg ATChCl. Po 25 µl raztopine smo odpipetirali v posamezne mikrocentrifugirke in jih zamrznili. Tako smo imeli na razpolago odmerke za enkratno uporabo.

### 3.2.3.3 Meritev aktivnosti AChE

Pripravili smo Ellmanov reagent in substrat; zmešali smo 10 ml Ellmanovega reagenta in 20 µl 1M ATChCl ter mešanico prestavili v banjico za multikanalno pipeto, ki smo jo do uporabe pokrili z aluminijasto folijo. Delali smo po naslednjem zaporedju: 50 µl vzorca smo v treh paralelkah nanesti na mikrotitrsko ploščo, dodali 50 µl K-P pufra in 100 µl Ellmanovega reagenta z ATChCl. Pomagali smo si z multikanalno pipeto, saj se z zadnjim korakom prične reakcija med encimom in substratom. Po dodatku Ellmanovega reagenta z ATChCl smo takoj pričeli z meritvijo na čitalcu mikrotitrskih plošč Anthos Zenyth 3100. Za

slepi poskus je bil namesto homogenata uporabljen K-P pufer z 0.5% v/v Triton detergenta (Sigma). Absorbanco smo merili 5 minut pri valovni dolžini 405 nm, v 30 sekundnih intervalih.

### **3.2.4 Določanje aktivnosti GST**

Aktivnost GST smo določili po metodi Habig in sod. (1974), prilagojeni za mikrotitrsko plošče. Za substrat smo uporabili 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), katerega so izoencimi GST konjugirali z reduciranim glutationom v dinitrofenil-tioeter. CDNB smo uporabili kot substrat, ker ga Habig in sod. (1974) navajajo kot aromatski substrat, ki ga konjugirajo vsi encimi, ki so jih testirali, četudi so imeli različni encimi GST različno afiniteto do njega.

#### **3.2.4.1 Priprava raztopine 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB)**

Zatehtali smo 10 mg kristalov 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (Sigma) in jih raztopili v 1 ml 96% EtOH. Da se je ves CDNB raztopil, smo raztopimo vsaj 1 minuto stresali. Zatem smo raztopino 12.5-krat razredčili z dH<sub>2</sub>O, da smo dobili 50 mM raztopino CDNB. Sveža raztopina je bila vsakič pripravljena tik pred poskusom.

#### **3.2.4.2 Priprava raztopine reduciranega glutationa (GSH)**

Natehtali smo 12.3 mg GSH (Sigma) v 1 ml K-P pufru in nato z K-P pufrom razredčili 10-krat, da smo dobili 50 mM raztopino GSH. Sveža raztopina je bila vsakič pripravljena tik pred poskusom.

#### **3.2.4.3 Meritev aktivnosti GST**

Delali smo po naslednjem zaporedju: 50 µl vzorca smo v treh paralelkah nanegli na mikrotitrsko ploščo, dodali 50 µl K-P pufru, 50 µl raztopine CDNB in 50 µl raztopine GSH. Pomagali smo si z multikanalno pipeto, saj se z zadnjim korakom prične reakcija med encimom in substratom. Po dodatku raztopine GSH smo takoj pričeli z meritvijo na čitalcu mikrotitrskih plošč Anthos Zenyth 3100. Za slepi poskus je bil namesto homogenata uporabljen K-P pufer z 0.5% v/v Triton detergenta. Absorbanco smo merili 3 minute pri valovni dolžini 340 nm v 30-sekundnih intervalih.

### **3.2.5 Določanje količine proteinov**

Supernatant, ki smo ga uporabili tudi za kvantifikacijo encimske aktivnosti, smo uporabili tudi za kvantifikacijo vsebnosti proteinov. Uporabili smo metodo z reagenti BCA Protein Assay (Pierce). Količino proteinov v supernatantu smo določili z umeritveno krivuljo, ki smo jo preračunali iz absorpcije standardov z znano koncentracijo proteinov.

### 3.2.5.1 Priprava standardov

Za pripravo standardov smo uporabili založno raztopino govejega serumskega albumina (BSA, Sigma). Iz založne raztopine z 200 mg/ml BSA smo z redčenjem z dH<sub>2</sub>O pripravili standarde z 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 in 0 mg/ml BSA. Absorbanco standardov smo, enako kot tisto od vzorcev, izmerili v treh paralelkah.

### 3.2.5.2 Meritev količine proteinov

V treh paralelkah smo 20 µl supernatanta nanесли na mikrotitrsko ploščo in dodali 200 µl mešanice reagentov A in B Pierce BCA Protein Assay (Pierce). Reagent A in B sta bila zmešana v razmerju 50:1, glede na navodila proizvajalca. Mikrotitrsko ploščo z vzorci je bila inkubirana 30 minut na 37 °C. Za slepi poskus je bila uporabljena dH<sub>2</sub>O. Absorbanco smo izmerili pri 562 nm valovne dolžine na čitalcu mikrotitrskih plošč BioTek CYTATION 3.

### 3.2.6 Priprava homogenata za določanje količine lipidov in količine ogljikovih hidratov

Za določanje količine lipidov in količine ogljikovih hidratov smo osebke (N = 20) homogenizirali z ULTRA-TURRAX IKA T10 basic v 800 µl dH<sub>2</sub>O v steklenih epruvetah. Homogenizirali smo 40 sekund na 5. stopnji jakosti, tako da smo epruveto rahlo premikali navzgor in navzdol, vendar je bila konica homogenizatorja vedno potopljena. Med homogenizacijo je bila steklena epruveta potopljena v ledeno kopel, da smo preprečili segrevanje homogenata. Med posameznimi vzorci smo homogenizator dobro sprali z dH<sub>2</sub>O in ga obrisali. Po koncu homogeniziranja smo homogenizator dvakrat sprali z dH<sub>2</sub>O in zatem še s 40% EtOH.

Homogenat, ki smo ga s tem dobili, smo uporabili za določanje količine lipidov in količine ogljikovih hidratov v osebkih. Tako smo za posamezen osebek dobili podatek o količini lipidov in ogljikovih hidratov. Homogenat smo za oba poskusa uporabili v roku treh dni in je bil med poskusoma shranjen na -20°C

### 3.2.7 Določanje količine lipidov

Lipide smo iz osebkov ekstrahirali po metodi Bligh in Dyer (1959), meritev pa smo izvedli po metodi Ferreira in sod. (2010). Količino lipidov smo določali glede na umeritveno krivuljo standardov z znanimi koncentracijami lipidov.

#### 3.2.7.1 Priprava standardov

Za pripravo standardov smo uporabili glicerol tripalmitat (Sigma) v prahu, ki smo ga raztopili v kloroformu. Najprej smo pripravili založno raztopino z 3.2 mg/ml glicerol tripalmitata, iz katere smo pripravili standarde z 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 in 0 mg/ml glicerol tripalmitata v kloroformu.

### 3.2.7.2 Meritev količine lipidov

300  $\mu\text{l}$  homogenata smo dodali 500  $\mu\text{l}$  kloroforma (Merck) in 500  $\mu\text{l}$  metanola (Merck). Suspenzijo smo stresali 1.5 minute, nato smo dodali 250  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  in ponovno stresali 1.5 minute. Mešanico smo centrifugirali 10 minut pri 1000 g in odpipetirali 100  $\mu\text{l}$  kloroformove faze z ekstrahiranimi lipidi v stekleno epruveto, dodali 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck) ter 15 minut inkubirali na 200 °C. Zatem smo epruvete preložili v stojalo, počakali da so se ohladile in dodali 500  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ . Po stresanju in ponovni ohladitvi smo po 200  $\mu\text{l}$  odpipetirali na mikrotitrsko ploščo. Enak postopek smo izvedli za standarde in slepe poskuse. Za slep poskus smo namesto homogenata uporabili enako količino  $\text{dH}_2\text{O}$ . Absorbanco smo izmerili pri 375 nm.

### 3.2.8 Določanje količine ogljikovih hidratov

Količino ogljikovih hidratov smo določili po metodi Albalasmeh in sod. (2013), po kateri merimo absorbcijo furfurala (in njegovih derivatov), ki je stranski produkt hidrolize ogljikovih hidratov s koncentrirano žvepleno kislino. Temelji na metodi, ki so jo razvili DuBois in sod. (1956), le da so ti dodali fenol, ki je razvil barvo v reakciji s furfuralom. Z uporabo novejših metode smo sicer merili absorbanco v UV spektru, vendar smo se s tem izognili zdravstvenemu tveganju povezanim z uporabo fenola, hkrati pa je priprava vzorca za meritev hitrejša.

#### 3.2.8.1 Priprava standardov

Za pripravo standardov smo uporabili glukozo v prahu (Merck), ki smo jo raztopili v  $\text{dH}_2\text{O}$ . Najprej smo pripravili založno raztopino z 1 mg/ml glukoze, iz katere smo pripravili standarde z 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0315, 0.016 in 0 mg/ml glukoze.

#### 3.2.8.2 Meritev količine ogljikovih hidratov

300  $\mu\text{l}$  homogenata smo dodali 100  $\mu\text{l}$  15% trikloroocetne kisline (Sigma), stresali in inkubirali 10 min na -20 °C. Mešanico smo centrifugirali 10 minut na 1000 g in supernatant uporabili v nadaljevanju postopka. Vzeli smo 300  $\mu\text{l}$  supernatanta in ga dvakrat razredčili s  $\text{dH}_2\text{O}$ . V nadaljevanju smo delali v treh paralelkah. 150  $\mu\text{l}$  vzorca smo odpipetirali v epruveto za razklop in v sredino vzorca na hitro dodali 450  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Mešanico smo stresali in ohladili. Enak postopek smo izvedli za standarde in slepe poskuse. Za slepi poskus smo namesto homogenata uporabili enako količino  $\text{dH}_2\text{O}$ . Na mikrotitrsko ploščo smo napipetirali po 200  $\mu\text{l}$  in izmerili absorbanco pri 315 nm valovne dolžine. Za pripravo standardov je bila pripravljena raztopina glukoze v  $\text{dH}_2\text{O}$ . Absorbanco smo izmerili pri 315 nm.

### 3.3 ANALIZA PODATKOV

V nadaljevanju opisujemo postopke, s katerimi smo kvantificirali meritve biomarkerjev in podatke statistično obdelali.

#### 3.3.1 Kvantifikacija meritev biomarkerjev

##### 3.3.1.1 Kvantifikacija aktivnosti AChE

Za izračun aktivnosti AChE smo izračunali razliko v absorbanci med 4. in 3. minuto merjenja, ko je bila kinetika encimske reakcija linearna. Razliko v koncentraciji smo izračunali glede na Lambert-Beerov zakon, ki pravi, da je absorbanca premo sorazmerna s koncentracijo snovi v raztopini, dolžino optične poti in ekstinkcijskim koeficientom. Slednji za anion 5-tio-2-nitro-benzojske kisline pri svetlobi z valovno dolžino 412 nm znaša  $13600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (Ellman in sod., 1961). Encimsko aktivnost smo izrazili kot specifično aktivnost encima (v nmol produkta na mg proteina v vzorcu na minuto).

##### 3.3.1.2 Kvantifikacija aktivnosti GST

Za izračun aktivnosti GST smo izračunali razliko v absorbanci med 90. in 150. sekundo merjenja, ko je bila kinetika encimske reakcija linearna. Razliko v koncentraciji smo izračunali glede na Lambert-Beerov zakon, ki pravi, da je absorbanca premo sorazmerna s koncentracijo snovi v raztopini, dolžino optične poti in ekstinkcijskim koeficientom. Slednji za dinitrofenil-tioeter pri svetlobi z valovno dolžino 340 nm znaša  $9600 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (Habig in sod., 1961). Encimsko aktivnost smo izrazili kot specifično aktivnost encima (v nmol produkta na mg proteina v vzorcu na minuto).

##### 3.3.1.3 Kvantifikacija količine proteinov

Iz izmerjenih standardov smo izračunali enačbo umeritvene krivulje. Iz dobljene enačbe smo nato preračunali količino proteinov v supernatantu. Količino proteinov smo uporabili za izražanje specifične aktivnosti encimov, prav tako smo izrazili njihovo vsebnost na svežo maso osebkov.

##### 3.3.1.4 Kvantifikacija količine lipidov

Iz izmerjenih standardov smo izračunali enačbo umeritvene krivulje. Iz dobljene enačbe smo nato preračunali količino lipidov v homogenatu. Količino lipidov smo izrazili na svežo maso osebkov.

### 3.3.1.5 Kvantifikacija količine ogljikovih hidratov

Iz izmerjenih standardov smo izračunali enačbo umeritvene krivulje. Iz dobljene enačbe smo nato preračunali količino ogljikovih hidratov v homogenatu. Količino ogljikovih hidratov smo izrazili na svežo maso osebkov.

### 3.3.2 Statistična obdelava podatkov

Podatke smo statistično obdelali v programskem okolju R, verzija 3.1.2, (R Core Team, 2015) uporabili smo program R Studio (RStudio Team, 2015). Poleg temeljnih funkcij smo uporabili tudi pakete, ki so naštetih spodaj.

Ker podatki tudi po transformaciji niso ustrezali zahtevam parametričnih testov (predvsem normalni porazdelitvi podatkov in homogenosti variance skupin), smo se odločili za uporabo neparametričnih testov. Razlike med skupinami smo testirali s Kruskal-Wallisovim testom vsote rangov. Za testiranje le dveh skupin smo uporabili Mann-Whitneyev test. Naknadne (post hoc) analize smo izvedli z Dunnovim testom multiplih primerjav, ki uporablja vsote rangov (Dunn, 1964), iz paketa »dunn.test« (Dinno, 2016).

Za statistično značilne razlike med skupinami podatkov smo označili tiste, katerih vrednost  $p$  je bila manjša od 0.05 ( $p < 0.05$ ). Izbrana stopnja značilnosti je bila 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

Med obdelavo podatkov smo uporabili tudi naslednje pakete za R: »ggplot2« (Wickham, 2009), »plyr« (Wickham, 2011), »data.table« (Dowle in sod., 2015), »doBy« (Hojsgaard in Halekoh, 2015), »rJava« (Urbanek, 2016), »xlsx« (Dragulescu, 2014) in »Hmisc« (Harrell in sod., 2016).

### 3.3.3 Grafikoni

Grafikone smo izdelali s paketom »ggplot2« za R (Wickham, 2009). Za prikaz večine podatkov smo uporabili grafikon kvartilov (imenovani tudi »škatla z brki« ali angleško »box-and-whisker plot«). Spodnji in zgornji rob škatle pri tem tipu grafikona prikazujeta prvi in tretji kvartil, vodoravna odebeljena črta v škatli pa mediano (drugi kvartil). Navpične črte, ki se iztegujejo iz škatle (t.i. brki) zajemajo najnižjo oz. najvišjo vrednost, ki je še vedno znotraj 1.5 kvartilnega razmika spodnjega oz. zgornjega kvartila. Točke, ki jih brki ali škatla ne zajemajo, so osamelci in so prikazani s piko (●). Tak tip grafikona kvartilov je znan tudi kot »Tukey boxplot« (Field in sod., 2012).



## 4 REZULTATI

V nadaljevanju predstavljamo podatke, zbrane med terenskim in laboratorijskim delom na vodnih osličkih. Opisali bomo rezultate meritev fizikalnih in kemijskih parametrov vode, analizo vodnih vzorcev, števila in spolne sestave vzorčenih živali, njihovo svežo maso in vrednosti merjenih biomarkerjev: aktivnost AChE in GST ter količine založnih snovi – lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov.

### 4.1 FIZIKALNI IN KEMIJSKI PARAMETRI VODE

V Preglednici 1 so prikazani rezultati merjenja fizikalnih in kemijskih parametrov vode, ki smo jih izmerili ob vzorčenju osebkov. Najvišjo temperaturo vode smo izmerili 17. 7. 2015 v Unici pri Jakovici (v Jakovici naprej v besedilu). Največji razliki v temperaturi vode sta bili v Jakovici in v Pivki v Postojni (v Postojni naprej v besedilu) ( $\Delta T = 20.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Najmanjše temperaturne razlike smo opazili v Pivki v Planinski jami (v Planinski jami naprej v besedilu). Za lokaliteto v Ljubljani imamo podatke le za pomlad in jesen, saj je poleti močvirje presahnilo.

Koncentracija kisika v vodi je sicer nihala glede na lokacijo in čas vzorčenja, a najnižje vrednosti smo opazili v močvirju v Ljubljani, višje pa spomladi na ostalih treh lokacijah.

Največji nasičenosti s  $\text{O}_2$  smo izmerili poleti v Jakovici in predvsem v Postojni, kjer je nasičenost znašala 137%. V Planinski jami je bil trend obraten, poleti je nasičenost s kisikom padla. Na splošno smo opazili najnižjo nasičenost s  $\text{O}_2$  v močvirju v Ljubljani. pH vode se je v času našega vzorčenja gibal med 7.25 in 8.48. Poleti smo opazili, da je prišlo do rahlega dviga pH vrednosti. Vrednosti pH v Ljubljani so bile najnižje. Najvišjo vrednost smo izmerili poleti v Postojni (pH 8.48), sicer pa pH na lokacijah ni presegal vrednosti 8.

Prevodnost vode se je gibala med  $310\text{ }\mu\text{S}$  in  $500\text{ }\mu\text{S}$ , a nismo ugotovili enotnega vzorca nihanja. V Postojni je prevodnost poleti narasla, medtem ko je na drugih dveh lokacijah padla. Na ostalih treh lokacijah smo najvišje vrednosti prevodnosti izmerili spomladi.

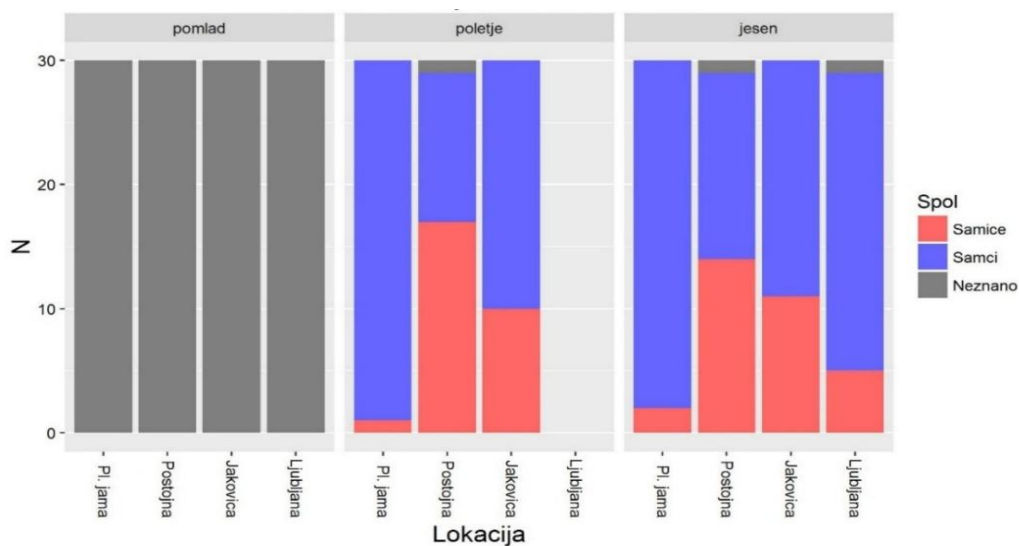
Najvišje vrednosti celokupnega organskega ogljika (TOC) smo izmerili v vodah iz pomladnega vzorčenja.

**Preglednica 1:** Fizikalni in kemijski parametri vode v času vzorčenja na različnih lokacijah. Prikazani so temperatura (T), koncentracija kisika O<sub>2</sub>, nasičenost s kisikom (O<sub>2</sub> sat), vrednost pH, prevodnost (C) in vrednost celokupnega organskega ogljika (TOC).

| lokacija       | datum      | T [°C] | O <sub>2</sub> [mg/l] | O <sub>2</sub> sat [%] | pH   | C [μS] | TOC [mg/L] |
|----------------|------------|--------|-----------------------|------------------------|------|--------|------------|
| Planinska jama | 18.3.2015  | 7.1    | 12                    | 90                     | 7.8  | 460    | 41.40      |
|                | 17.6.2015  | 9.2    | 7.7                   | 68.3                   | 7.98 | 392    | 20.90      |
|                | 12.10.2015 | 10.9   | 10                    | 91.3                   | 7.7  | 426    | 2.08       |
| Postojna       | 18.3.2015  | 7.3    | 10.24                 | 87                     | 7.73 | 430    | 34.10      |
|                | 17.7.2015  | 28     | 10.5                  | 137                    | 8.48 | 500    | 4.96       |
|                | 12.10.2015 | 11.5   | 8.7                   | 80.5                   | 7.68 | 419    | 1.45       |
| Jakovica       | 18.3.2015  | 7.8    | 6.38                  | 54.5                   | 7.25 | 470    | 75.01      |
|                | 17.7.2015  | 28.5   | 9                     | 115                    | 8    | 310    | 3.54       |
|                | 12.10.2015 | 12.2   | 7.8                   | 73                     | 7.44 | 409    | 2.34       |
| Ljubljana      | 19.3.2015  | 6      | 4                     | 35                     | 7.2  | 420    | /          |
|                | 21.10.2015 | 8      | 7                     | 58.8                   | 7.1  | 335    | 18.10      |

## 4.2 SPOLNA SESTAVA VZORČENIH ŽIVALI

Analizirali smo po 30 osebkov *A. aquaticus* na lokacijo v vsakem letnem času, razen poleti v Ljubljani, ker takrat živali ni bilo mogoče nabrati (Slika 6). Skupno smo tako analizirali 330 živali, od tega je bilo 60 samic, 147 samcev in 123 osebkov neznanega spola. Spomladi spola nismo določali, prav tako zaradi poškodb pri zmrzovanju nismo mogli določiti spola treh osebkov iz poletnega in jesenskega vzorčenja. Najmanj samic smo povzročili v Planinski jami, skupno 3. Največ samic smo povzročili v Postojni, sledita Jakovica in Ljubljana. Največ prekopul smo opazili spomladi, malo poleti in nobene jeseni. Ovigerih samic nismo vzorčili, a so bile prav tako najbolj številčne spomladi, poleti in jeseni pa smo jih opazili manj.



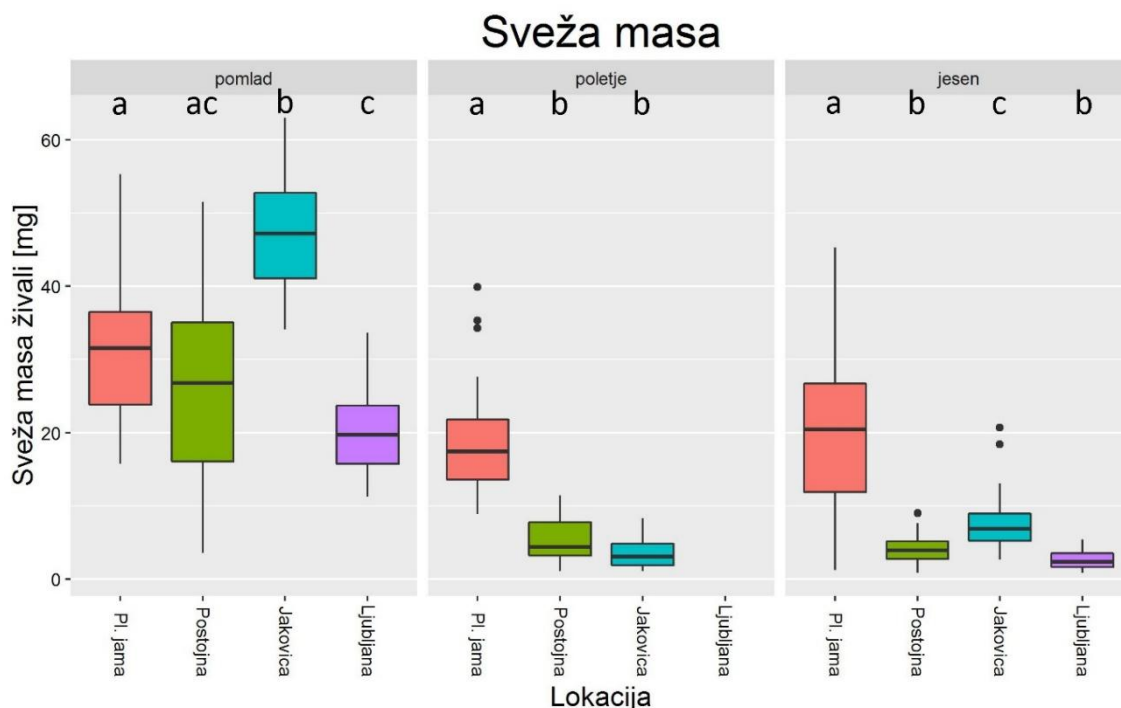
**Slika 7:** Spolna sestava vodnih osličkov glede na letni čas in lokacijo vzorčenja. N = število osebkov.

### 4.3 SVEŽA MASA ŽIVALI

Živali, ki smo jih vzorčili spomladi v Ljubljani, Planinski jami in Jakovici so se med seboj statistično značilno (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) razlikovale po sveži masi (Slika 8). Osebki iz Jakovice so imeli največjo svežo maso v tem vzorčenju in so se statistično značilno razlikovali od osebkov z ostalih treh lokacij. Značilnih razlike med svežo maso osebkov iz Planinske jame in Postojne ni bilo, prav tako ni bilo razlik med svežo maso osebkov iz Postojne in Ljubljane.

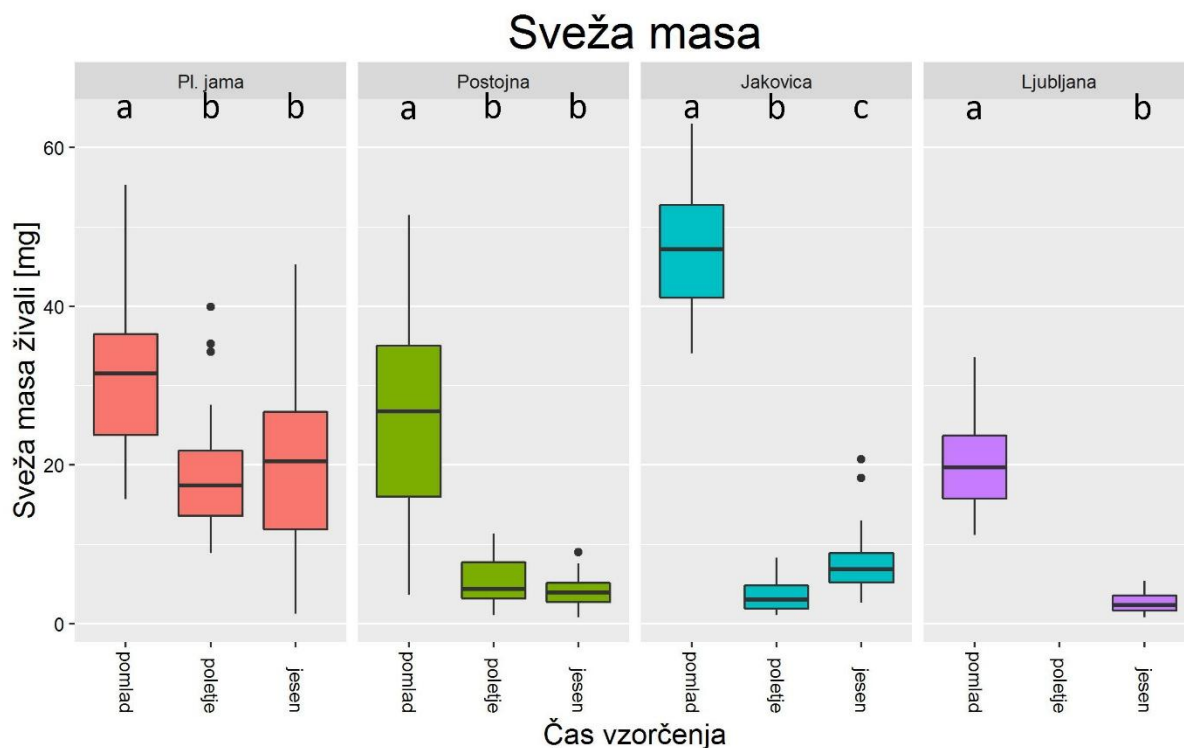
V poletnem vzorčenju se je statistično značilno (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) razlikovala sveža masa osebkov iz Planinske jame in ostalih dveh lokacij, med katerima ni bilo značilnih razlik. Osebki iz Planinske jame so imeli največjo povprečno svežo maso. Podatkov za Ljubljano v tem obdobju nimamo, saj je močvirje na lokaliteti popolnoma presahnilo.

Jeseni so imeli največjo povprečno svežo maso zopet osebki iz Planinske jame, hkrati pa so bile te vrednosti najbolj variabilne. Osebki iz Planinske jame so se statistično značilno (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) razlikovali od ostalih treh lokacij. Živali iz Jakovice so imele drugo največjo svežo maso, ki se je značilno razlikovala od ostalih treh lokacij. Med osebki iz Postojne in Ljubljane ni bilo značilnih razlik v sveži masi.



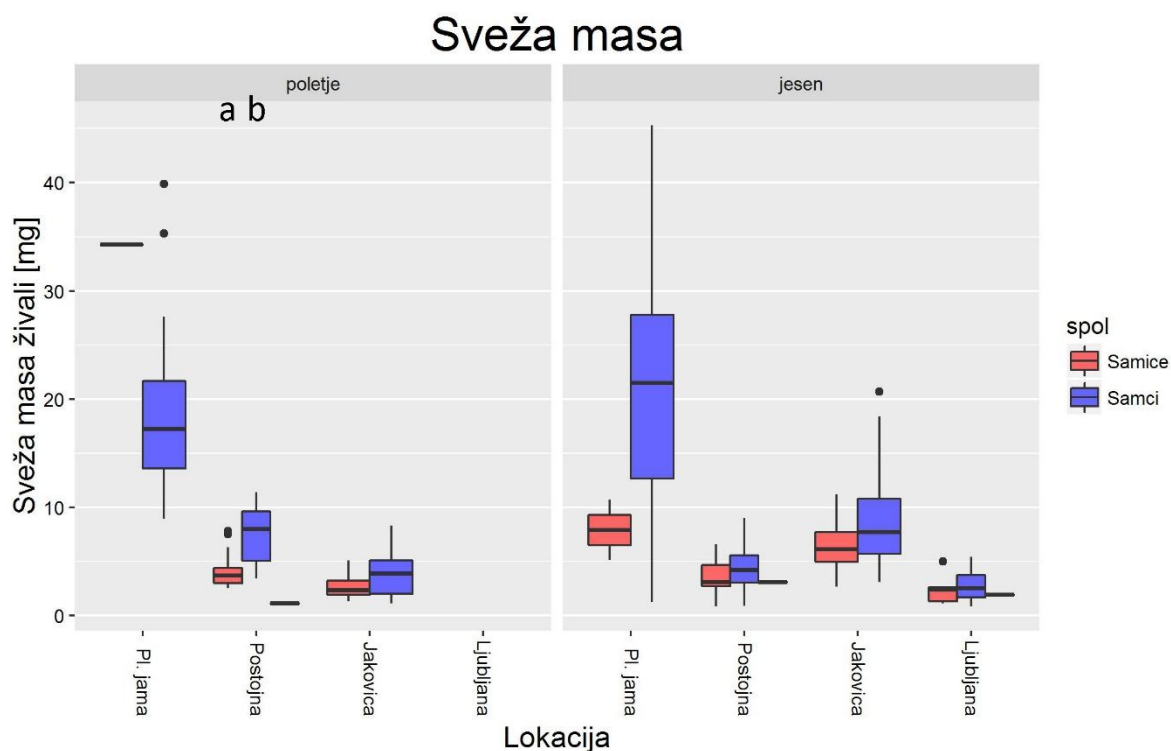
**Slika 8:** Grafikoni kvartilov sveže mase vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci, različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ),  $N=30$ .

Sveže mase osebkov iz vsake lokacije so se statistično značilno (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) razlikovale glede na letni čas (Slika 9). Na vseh lokacijah je bila sveža masa osebkov največja spomladi, hkrati pa značilno različna od poletnega in jesenskega vzorčenja. Sveža masa jeseni vzorčenih osebkov iz Jakovice je bila značilno večja od tiste poleti. V Planinski jami in Postojni nismo zabeležili razlik med osebki poletnega in jesenskega vzorčenja.



**Slika 9:** Grafikoni kvartilov sveže mase vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ).  $N=30$ .

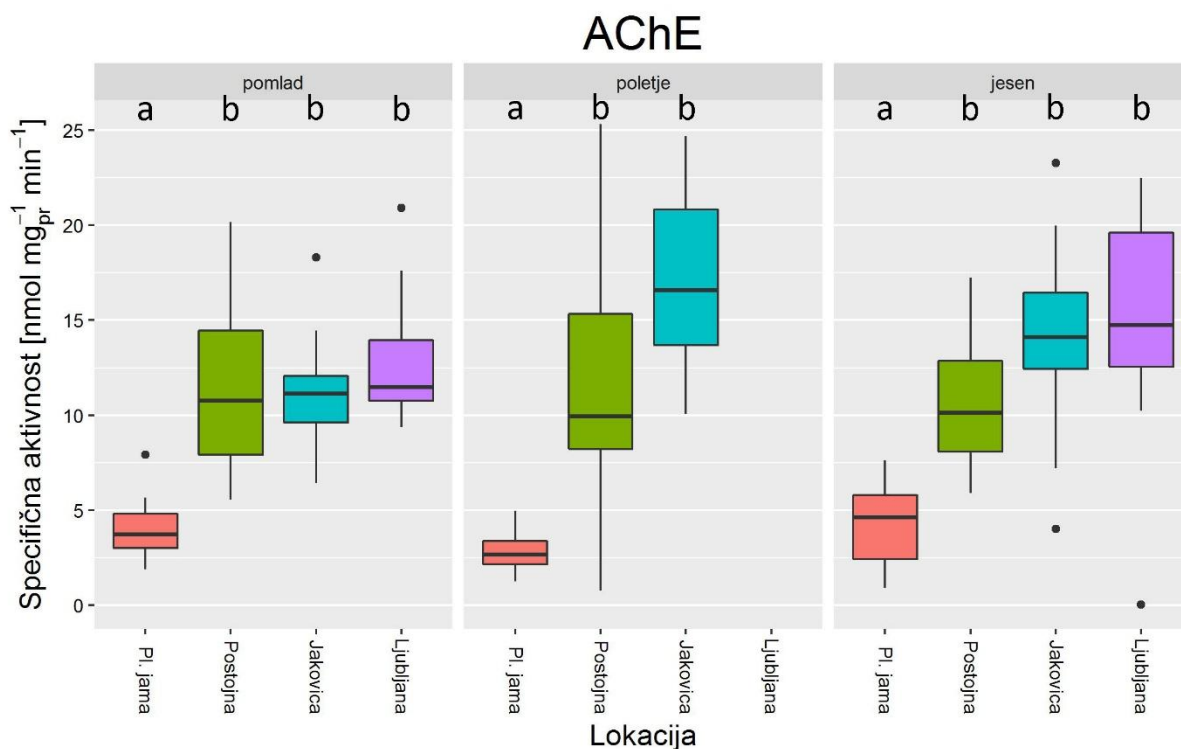
Analiza podatkov ločenih po spolu je pokazala le statistično značilno (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) razliko med svežo maso samcev in samic poletnega vzorčenja v Postojni (Slika 10). Poleti je bila v Planinski jami, nasprotno kot na drugih lokacijah, sveža masa samice med največjimi in je presegala maso večine samcev. V večini primerov so bile vrednosti sveže mase samcev nekoliko višje, vendar s statističnimi testi tega nismo mogli potrditi zaradi majhnega števila samic.



**Slika 10:** Grafikoni kvartilov sveže mase samcev in samic vodnih osličkov v poletnem in jesenskem obdobju, za vzorčene lokacije. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=30.

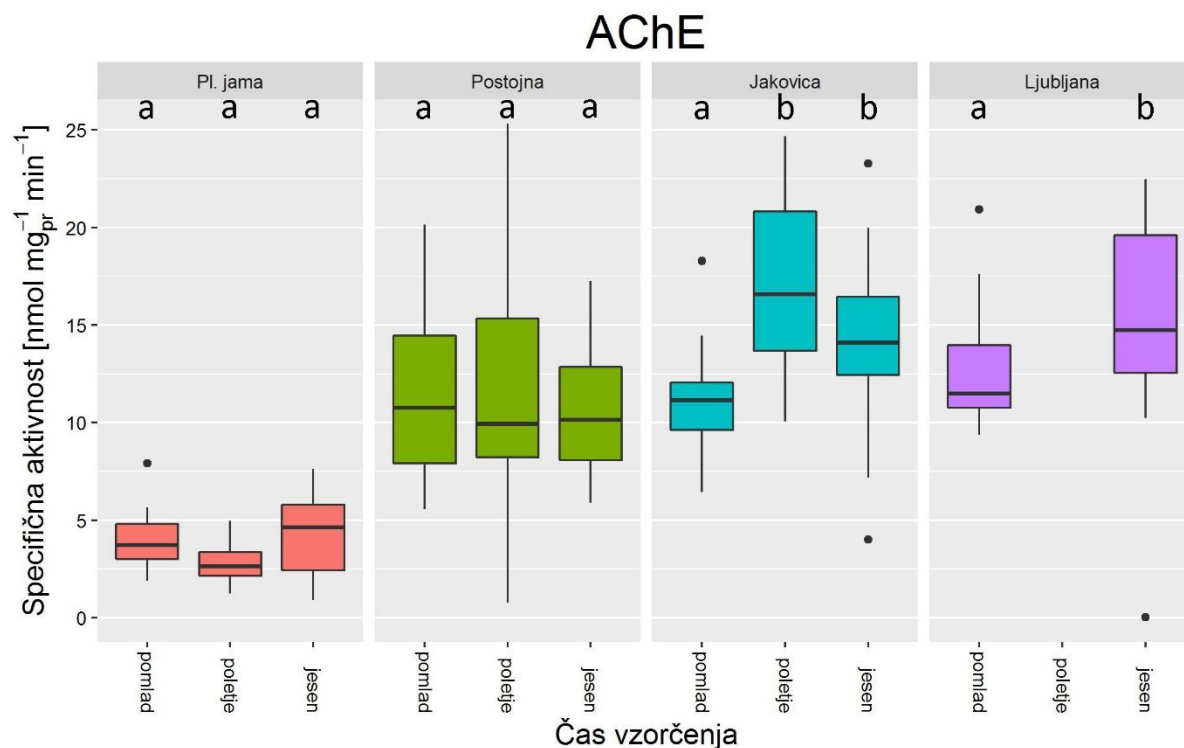
#### 4.4 AKTIVNOST AChE

Če primerjamo rezultate aktivnosti AChE po letnih časih opazimo, da so bile aktivnosti jamskih živali iz Planinske jame statistično značilno nižje (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) od tistih pri površinskih v vseh treh letnih časih. Med površinskimi vodnimi oslički (iz Postojne, Jakovice in Ljubljane) znotraj letnih časov ni bilo značilnih razlik (Slika 11).



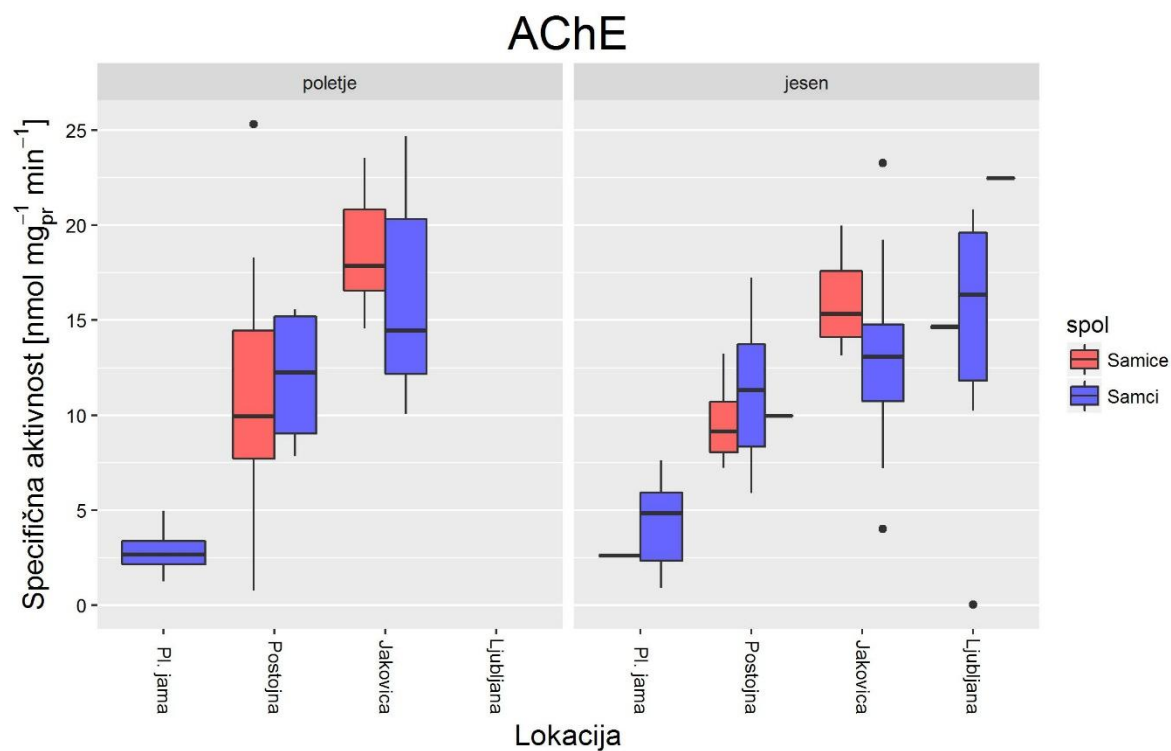
**Slika 11:** Grafikoni kvartilov aktivnosti AChE vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ).  $N=15$ .

Jamskim osebkom iz Planinske jame in površinskim iz Postojne se tekom leta vrednosti aktivnosti AChE niso spreminjale statistično značilno (Dunnov test,  $p < 0.05$ ). Varianca je bila v Postojni poleti večja kot v ostalih dveh obdobjih. Živali iz Jakovice ter Ljubljane so imele značilno nižjo specifično aktivnost AChE v pomladnem vzorčevalnem obdobju v primerjavi s poletnim in jesenskim (Slika 12).



**Slika 12:** Grafikoni kvartilov aktivnosti AChE vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

Med spoloma vodnih osličkov znotraj lokacije in sezone ni bilo statistično značilnih (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) razlik v specifični aktivnosti AChE (Slika 13).

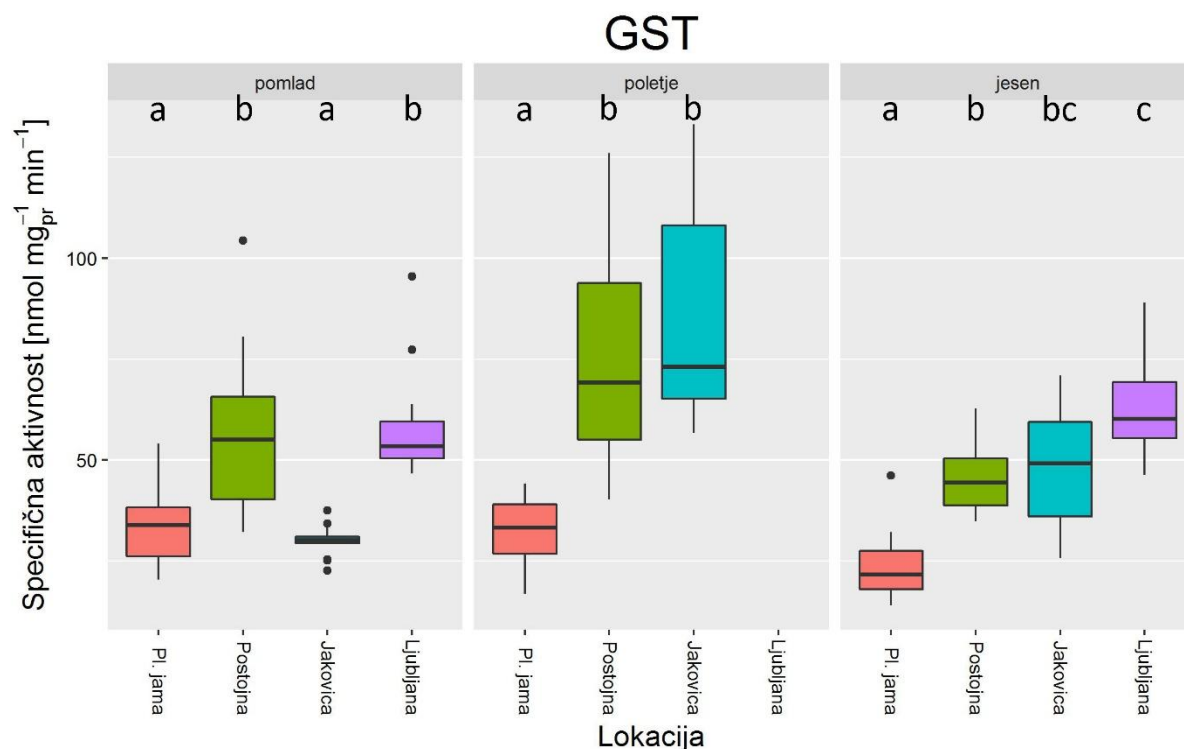


**Slika 13:** Grafikoni kvartilov aktivnosti AChE samcev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.



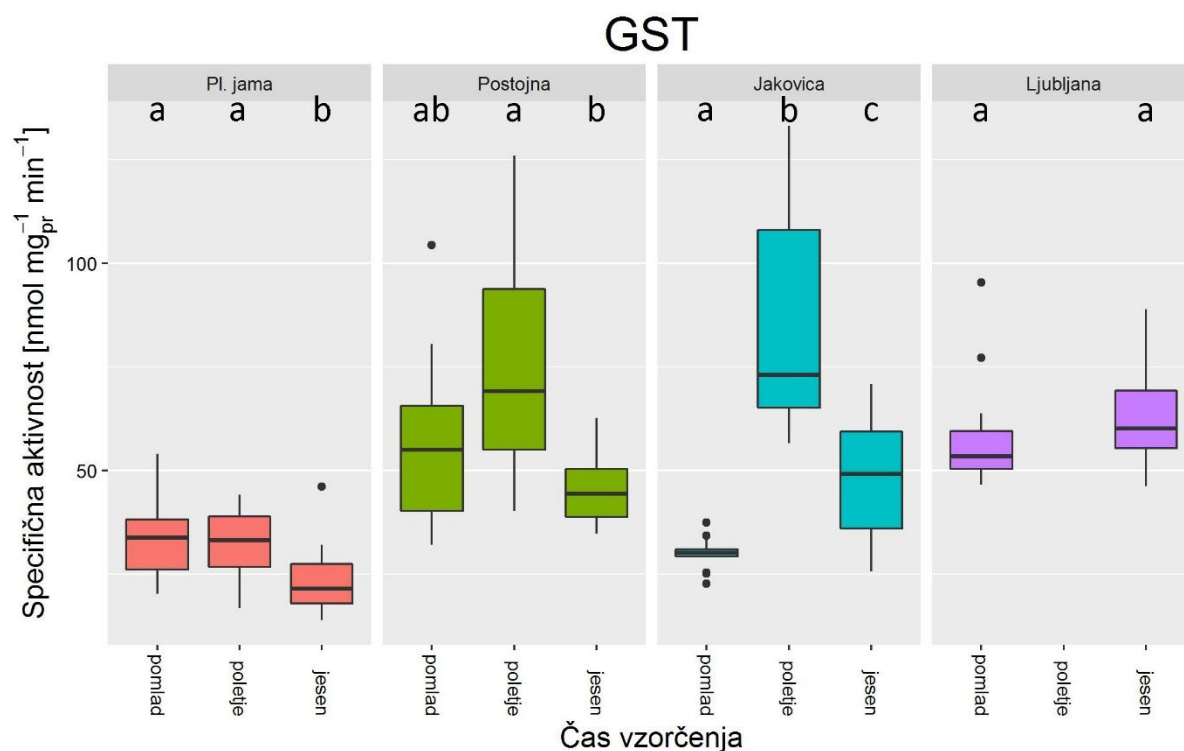
#### 4.5 AKTIVNOST GST

Če primerjamo aktivnosti GST med letnimi časi opazimo, da so bile aktivnosti jamskih živali iz Planinske jame statistično značilno nižje (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) od površinskih v vseh treh letnih časih, z izjemo Jakovice spomladi. Poleti med površinskima lokacijama ni bilo značilnih razlik. Jeseni je bila specifična aktivnost GST pri živalih iz Ljubljane višja od tiste pri Postojnskih (Slika 14).



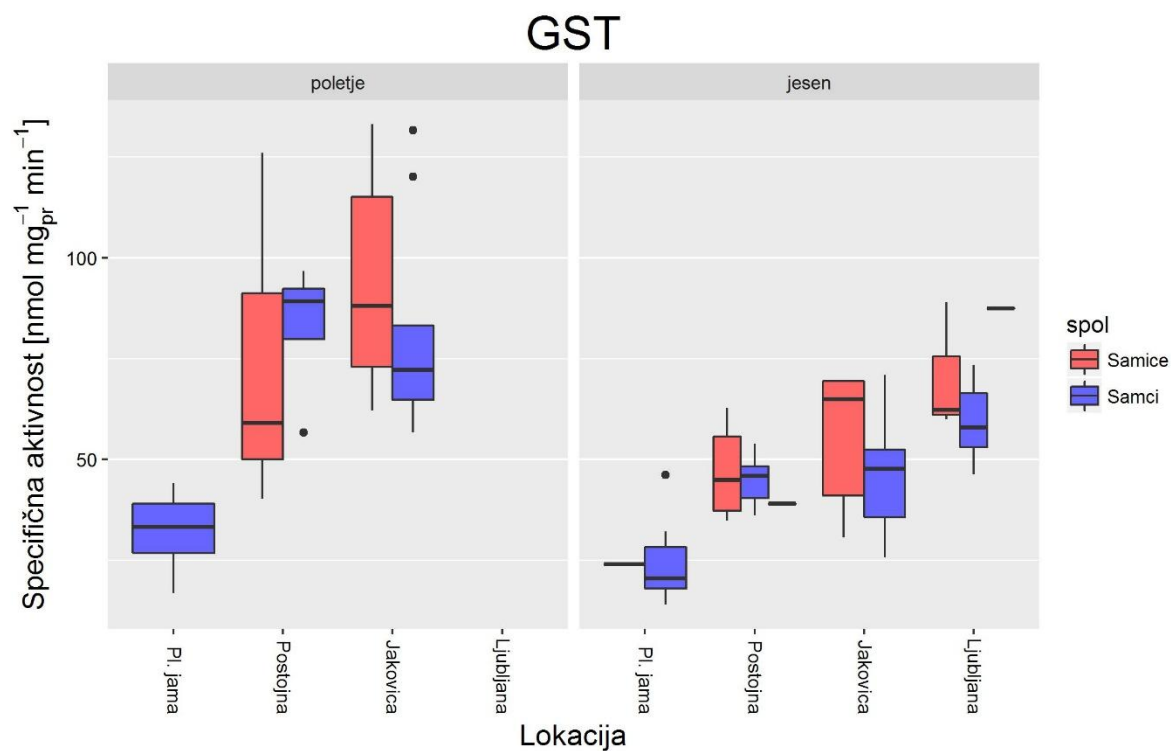
**Slika 14:** Grafikoni kvartilov aktivnosti GST vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

Pri jamskih osebkih iz Planinske jame so bile vrednosti aktivnosti GST jeseni statistično značilno nižje (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) od pomladnih in poletnih vrednosti. Vrednosti pri živalih iz Postojne so bile poleti značilno višje od jesenskih. V Jakovici so bile poleti aktivnosti GST značilno višje kot jeseni, ko pa so bile značilno višje od tistih spomladi. V Ljubljani ni bilo značilnih razlik med letnimi časi (Slika 15). Varianca poletnih vrednosti iz Postojne in Jakovice je bila višja kot v ostalih obdobjih.



**Slika 15:** Grafikoni kvartilov aktivnosti GST vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ).  $N=15$ .

Znotraj letnega časa in lokacije med spoloma ni bilo značilnih razlik (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) v aktivnosti GST vodnih osličkov (Slika 16).



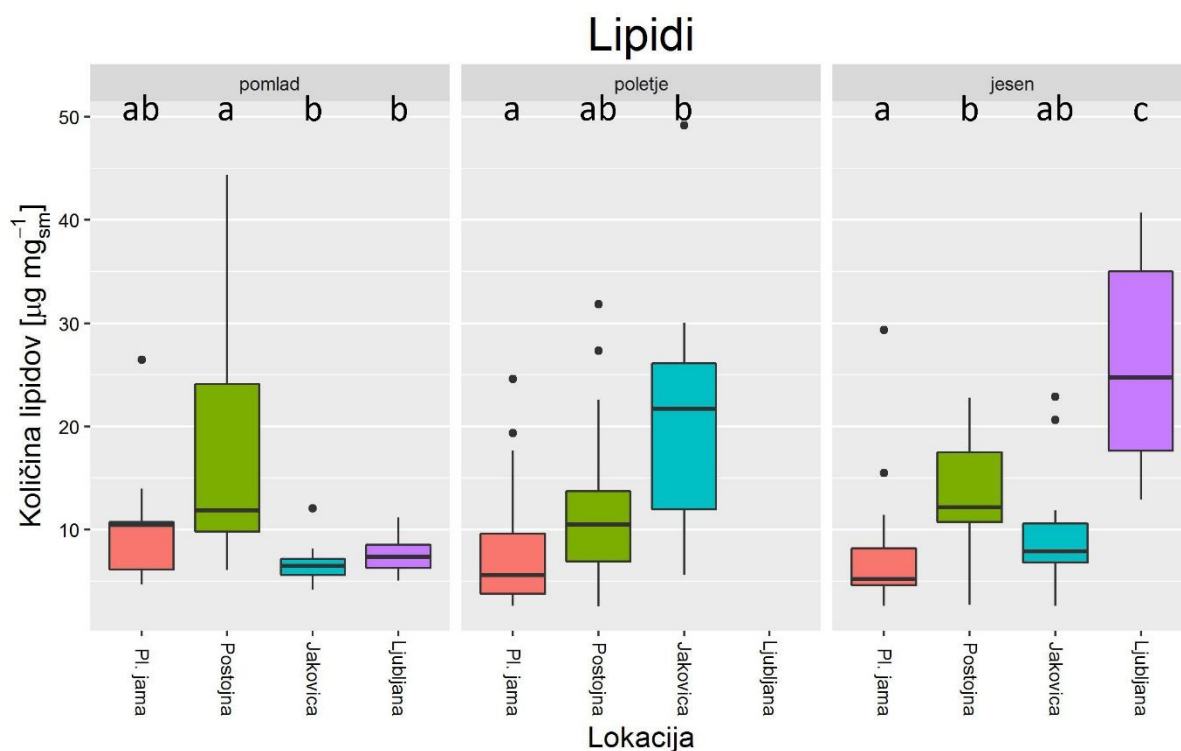
**Slika 16:** Grafikoni kvartilov aktivnosti GST samcev in samic vodnih za vzorčne lokacije, osličkov v poletnem in jesenskem obdobju. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

#### 4.6 KOLIČINA LIPIDOV

Količina lipidov vodnih osličkov iz Postojne je bila spomladi statistično značilno višja (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) od tistih iz Jakovice in Ljubljane. Pri spomladanskih vzorcih ni bilo značilnih razlik med osebki iz Planinske jame in ostalih lokacij (Slika 17).

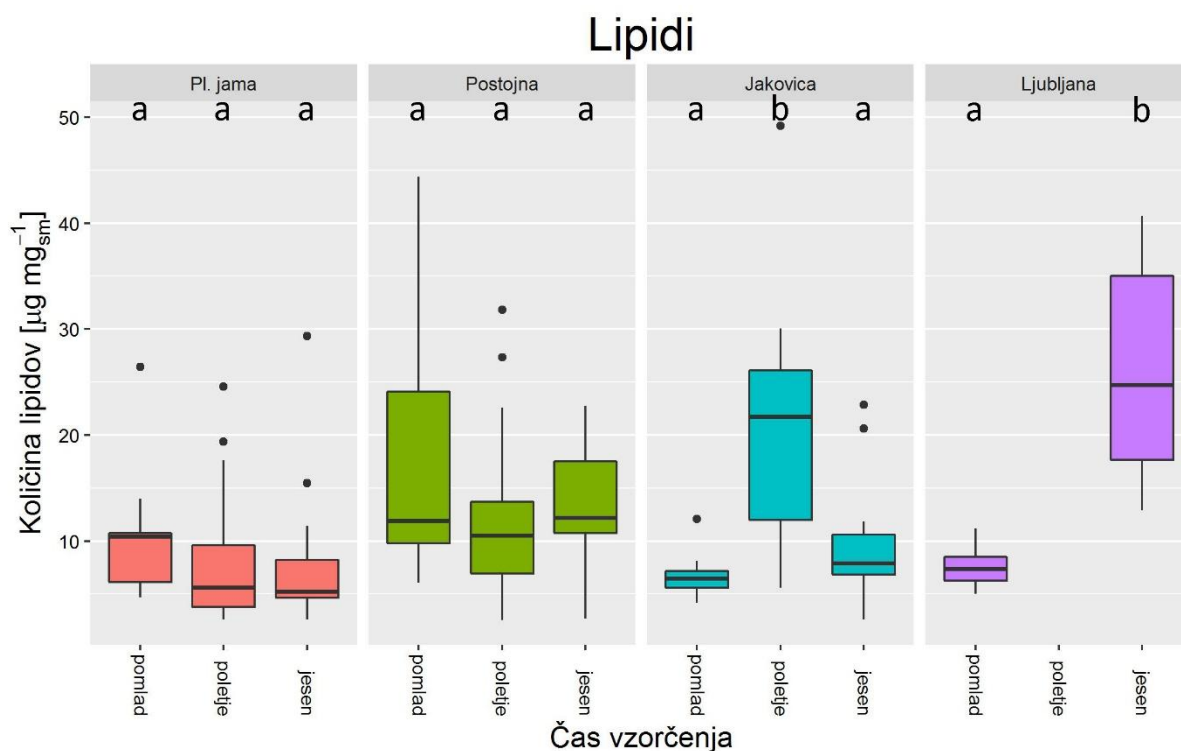
V poletnem vzorcu iz Planinske jame je bila količina lipidov statistično značilno nižja (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) od tiste iz vzorca v Jakovici. Značilnih razlik med vzorcem iz Postojne in ostalima lokacijama ni bilo.

V jesenskem vzorcu so imeli osebki iz Ljubljane statistično značilno višjo (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) količino lipidov od ostalih lokacij. Živali iz Postojne so imele značilno višjo količino lipidov od tistih iz Planinske jame.



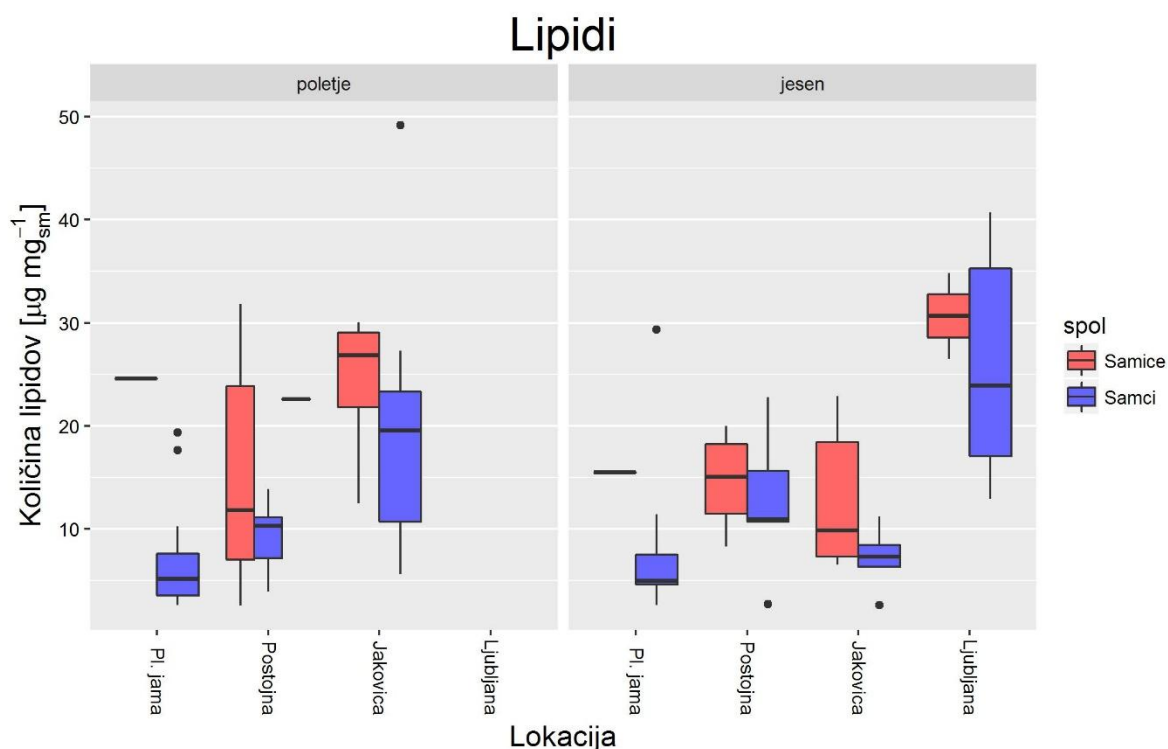
**Slika 17:** Grafikoni kvartilov količine lipidov vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ).  $N=15$ .

Pri vodnih osličkih iz Planinske jame sicer niso bile opazne statistično značilne razlike (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) v količini lipidov med letnimi časi, opazen pa je bil rahel trend padanja. Pri osebkih iz Postojne ni bilo značilnih razlik med letnimi časi. Količina lipidov poletnega vzorca vodnih osličkov v Jakovici je bila značilno višja od ostalih dveh obdobj. Živali iz jesenskega vzorčenja v Ljubljani so imele značilno višjo količino lipidov, kot tiste iz spomladanskega (Slika 18).



**Slika 18:** Grafikoni kvartilov količine lipidov vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ).  $N=15$ .

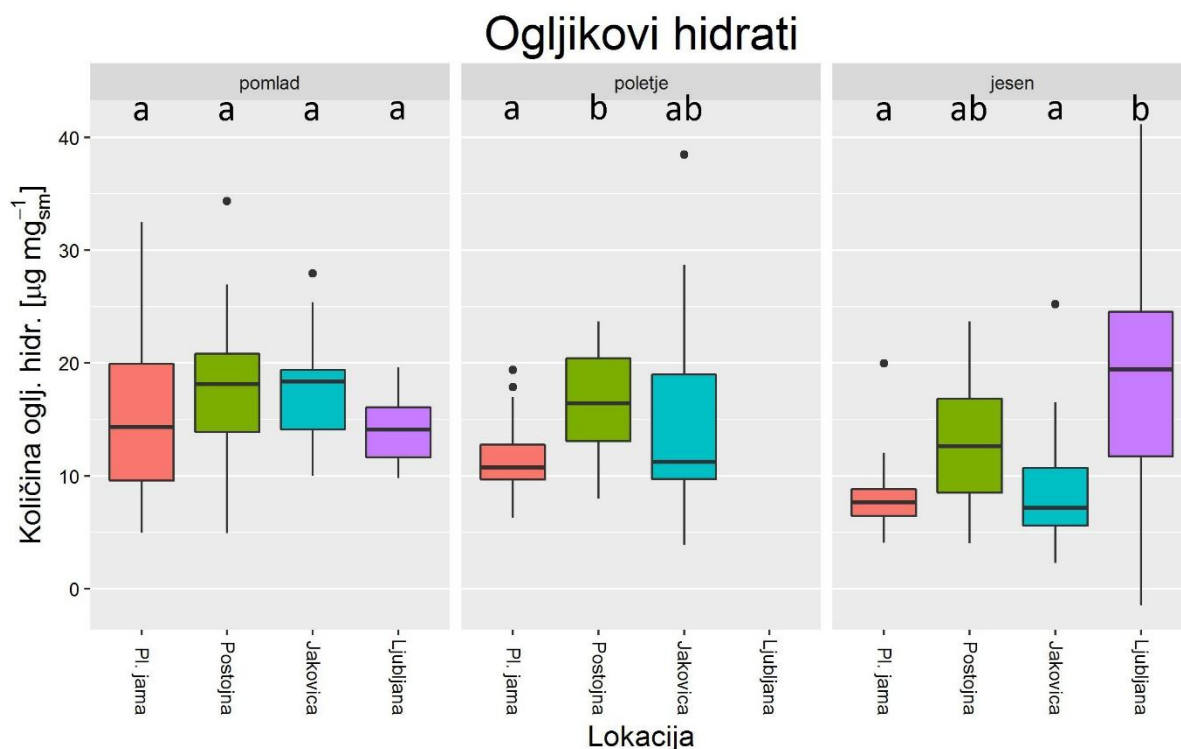
Znotraj letnega časa in lokacije med spoloma ni bilo statistično značilnih razlik (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) v količini lipidov, vendar pa je bila vsebnost lipidov pri samicah načeloma višja (Slika 19).



**Slika 19:** Grafikoni kvartilov količine lipidov samcev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ).  $N=15$ .

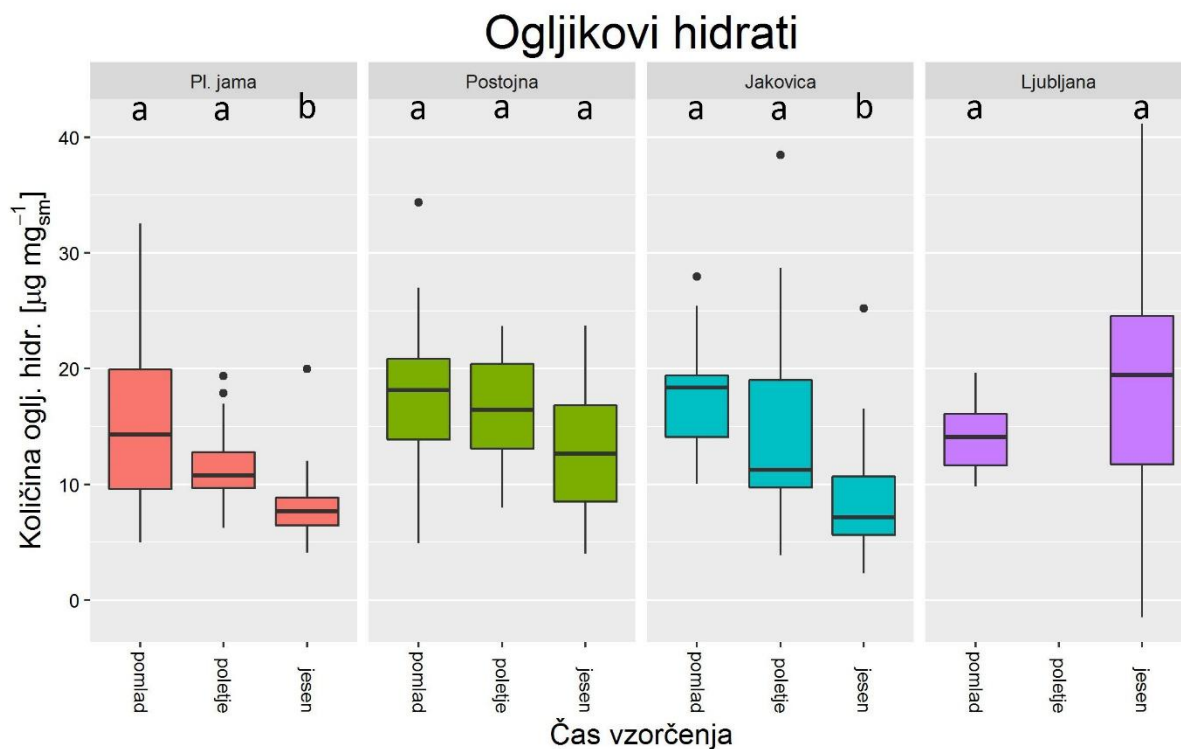
#### 4.7 KOLIČINA OGLJIKOVIH HIDRATOV

Spomladi pri vodnih osličkih med lokacijami ni bilo značilnih razlik (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) v količini ogljikovih hidratov. V poletnem obdobju je bila značilna razlika med osebki iz Planinske jame in Postojne. Jeseni so imeli osebki iz Ljubljane značilno višjo količino ogljikovih hidratov od tistih iz Planinske jame in Jakovice (Slika 20).



**Slika 20:** Grafikoni kvartilov količine ogljikovih hidratov vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

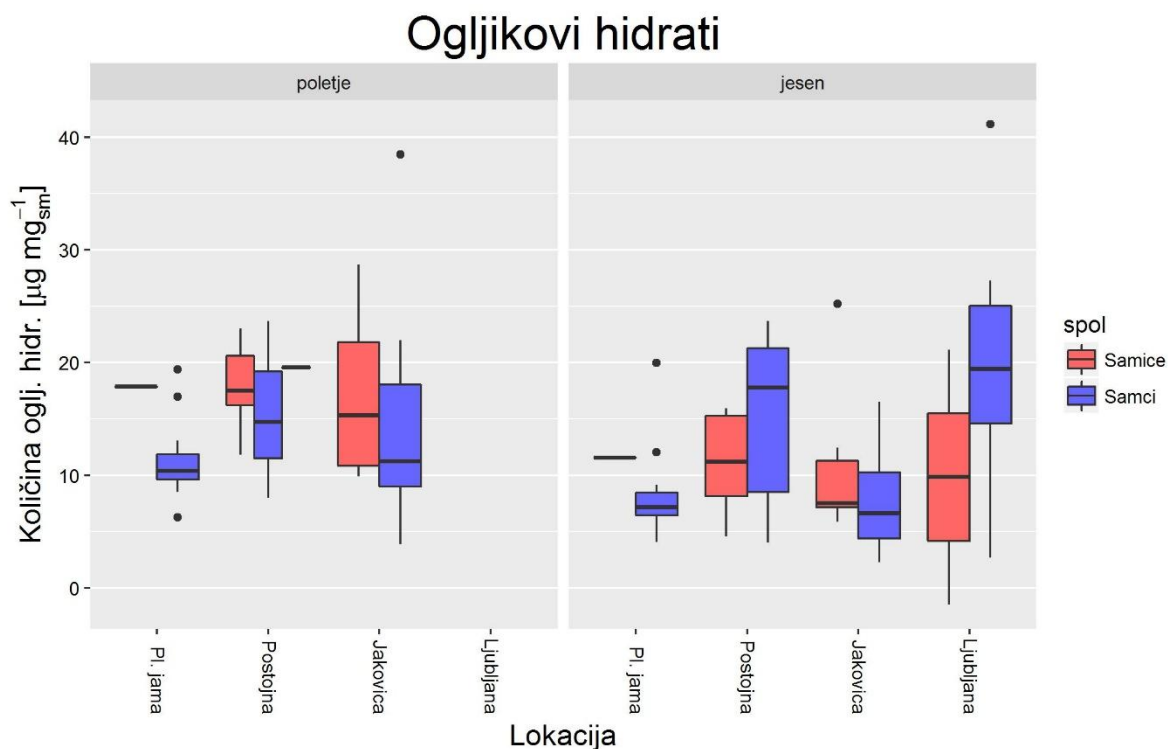
Količina ogljikovih hidratov je bila pri vodnih osličkih iz Planinske jame jeseni statistično značilno nižja (Dunnov test,  $p < 0.05$ ), kot v ostalih dveh obdobjih. Pri osebkih iz Postojne nismo opazili značilnih razlik med letnimi časi. Osebk iz Jakovice so imeli jeseni značilno nižjo količino ogljikovih hidratov. Na lokacijah Planinska jama, Postojna in Jakovica smo opazili trend upadanja količine ogljikovih hidratov čez leto, vendar razlike niso bile vedno statistično značilne (Slika 21). Ljubljanski osebk niso kazali značilnih razlik med pomladjo in jesenjo, vendar so bile jesenske vrednosti višje in imele so večjo varianco.



**Slika 21:** Grafikoni kvartilov količine ogljikovih hidratov vodnih osličkov v treh letnih časih, za vzorčene lokacije. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.



V količini ogljikovih hidratov ni bilo statistično značilnih razlik med spoloma (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) v količini ogljikovih hidratov vodnih osličkov znotraj letnega časa in lokacije (Slika 22).



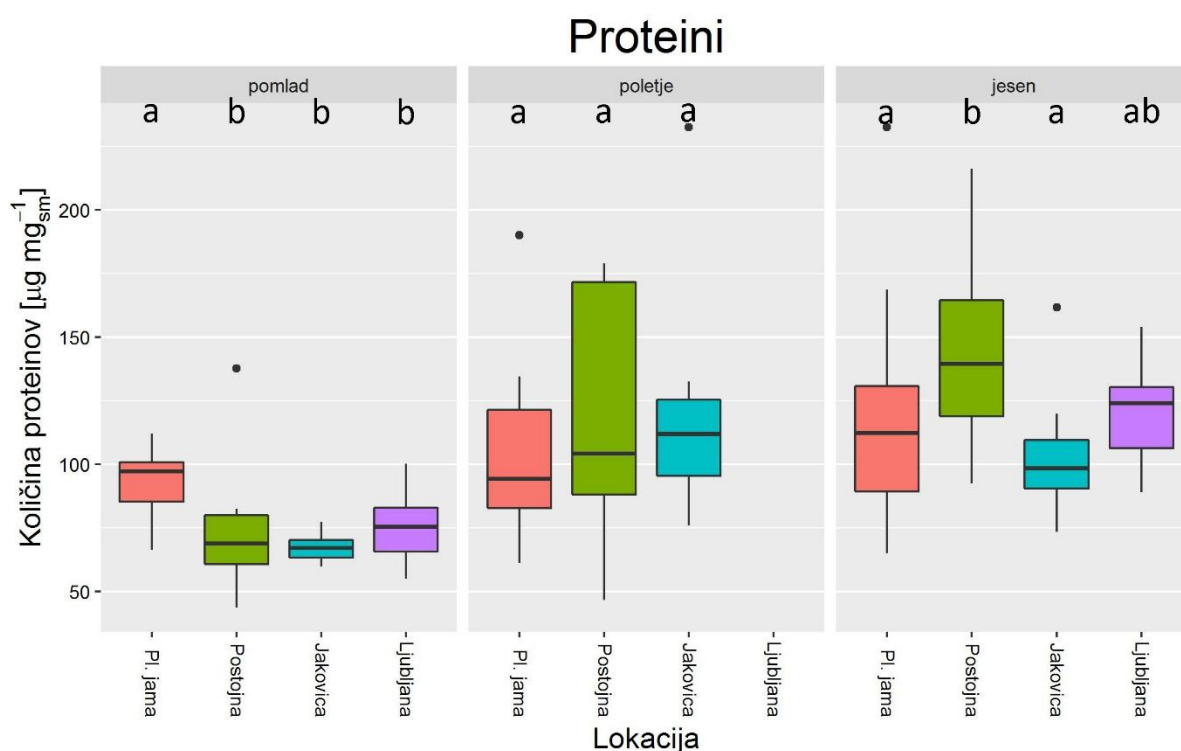
**Slika 22:** Grafikoni kvartilov količine ogljikovih hidratov samecev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

#### 4.8 KOLIČINA PROTEINOV

Spomladi so imeli vodni oslički iz Planinske jame statistično značilno višjo (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) količino proteinov kot osebki iz ostalih lokacij (Slika 23).

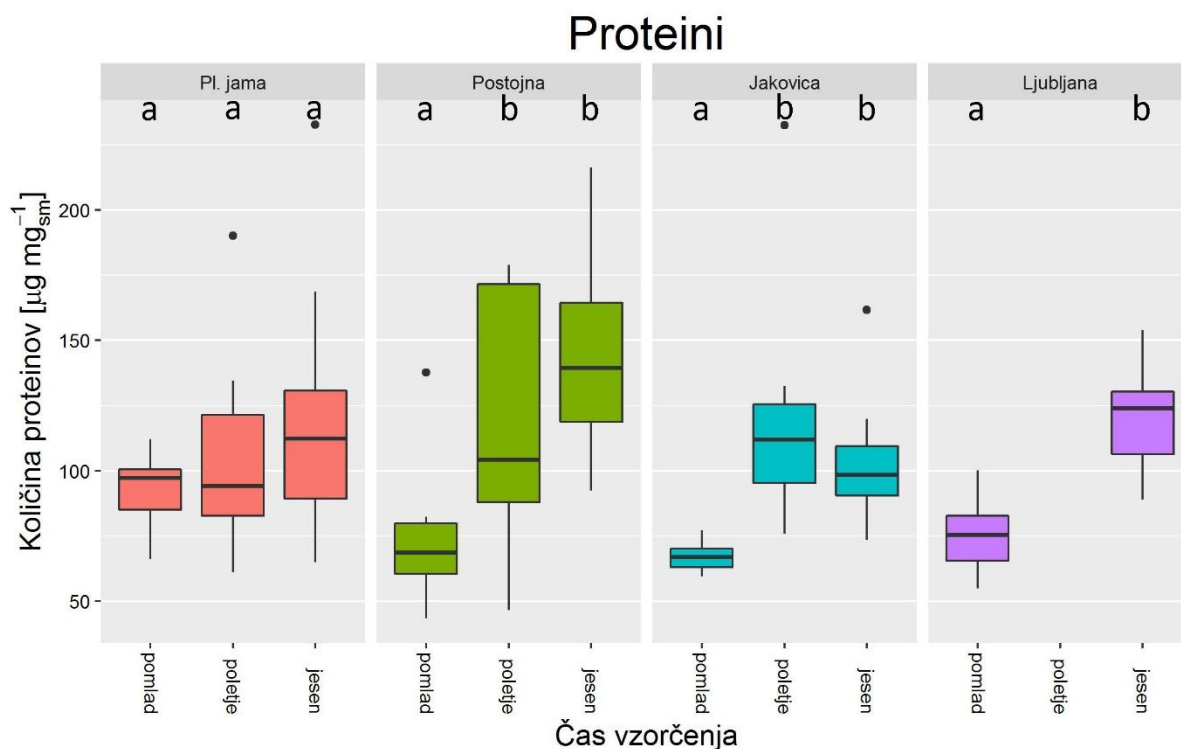
Poleti ni bilo statistično značilnih razlik (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) v količini proteinov med lokacijami.

Jeseni je bila količina proteinov pri osebkih iz Postojne statistično značilno višja (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) kot pri tistih iz Planinske jame in Jakovice, ni pa se značilno razlikovala od tiste pri Ljubljanskih.



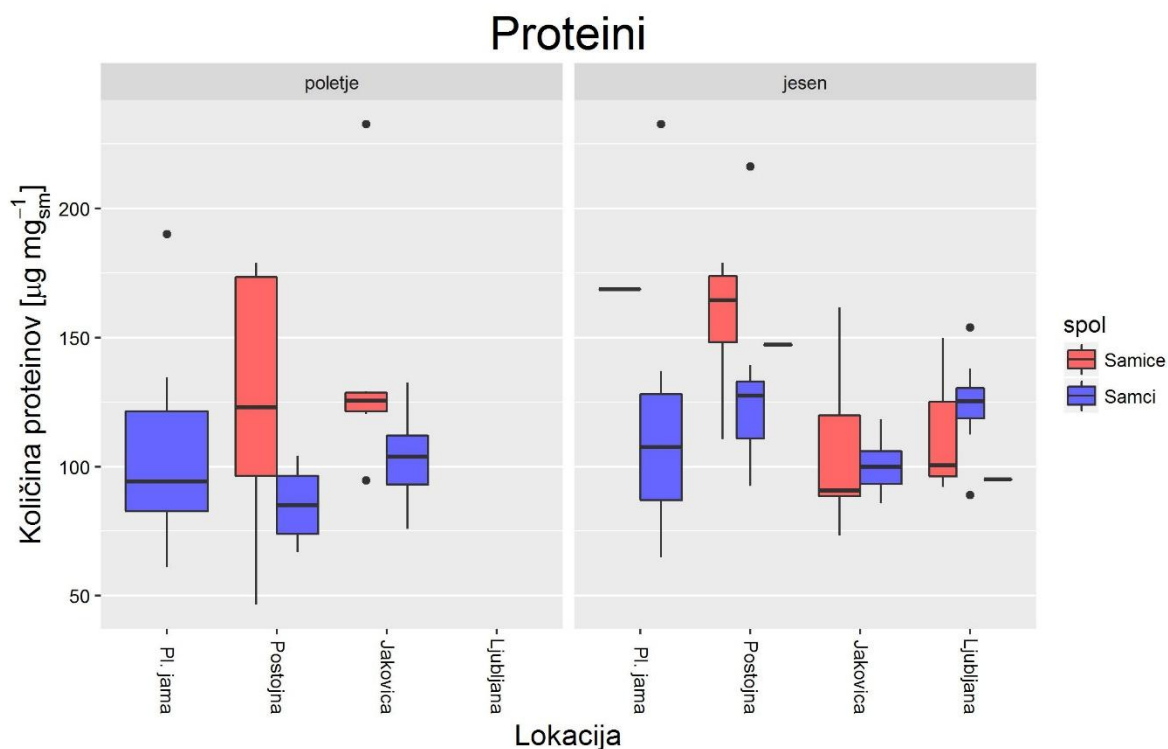
**Slika 23:** Grafikoni kvartilov količine proteinov vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v treh letnih časih. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

Na vseh štirih lokacijah smo opazili višjo količino proteinov v poletnih in jesenskih vzorcih, vendar pa je bila razlika statistično značilna (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) le pri površinskih lokacijah (Slika 24).



**Slika 24:** Grafikoni kvartilov količine proteinov vodnih osličkov za v treh letnih časih, vzorčene lokacije. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

V količini proteinov pri vodnih osličkih med spoloma ni bilo statistično značilnih razlik (Dunnov test,  $p < 0.05$ ) znotraj letnega časa in lokacije (Slika 25). Razlika med samicami in samci iz Jakovice v poletnem obdobju je skoraj statistično značilna ( $p = 0.066$ ).



**Slika 25:** Grafikoni kvartilov količine proteinov samcev in samic vodnih osličkov za vzorčene lokacije, v poletnem in jesenskem obdobju. Škatle – kvartili, brki – vrednosti znotraj 1,5 medkvartilnega razmika, pike – osamelci; različne črke – statistično značilne razlike ( $p < 0.05$ ). N=15.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 FIZIKALNI IN KEMIJSKI PARAMETRI VODE

Najbolj variabilen fizikalni parameter, ki smo ga izmerili, je bila temperatura. Velike temperaturne razlike med letnimi časi, ki smo jih izmerili na površinskih lokacijah (do 20.7 °C) in majhne razlike v Planinski jami (3.8 °C) so bile v skladu z našimi pričakovanji. Jame so namreč okolje, kjer temperatura malo niha (Culver in Pipan, 2009).

Razlog za več kot 100% poletno nasičenost vode s kisikom je bila verjetno eutrofičnost na dveh lokacijah (Postojni in Jakovici), kjer čez dan alge proizvajajo kisik, ponoči pa je nasičenost verjetno padla, ker so kisik porabljale. Nasičenost je med drugim zelo odvisna tudi od časa meritve. Najnižjo količino kisika v vodi smo izmerili v Ljubljani. Razlog za to je bila verjetno zasenčenost močvirja s krošnjami dreves in v vodi verjetno ni bilo veliko avtotrofov, ki bi kisik proizvajali. Hkrati je bilo v močvirju mnogo odmrle organske snovi, ki se je razkrajala, kar je prispevalo k porabi kisika. V jamah so okoljski dejavniki načeloma stabilnejši od tistih na površju, vendar se lahko občasno v jamskih vodah srečamo s hipoksijo (Hervant in sod., 1996; Hervant in sod., 1997; Mathieu in Hervant, 2004). V Planinski jami v času meritev nismo ugotovili hipoksičnih pogojev, vrednosti količine kisika iz jame niso bile med najnižjimi.

Poleti se je pH vode na vzorčenih lokacijah nekoliko dvignil. Domnevamo, da je poleti v Postojni in Jakovici pH med dnevom in nočjo nihal, zaradi sprememb količine O<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub>.

Fizikalne in kemijske parametre smo merili le ob vsakem vzorčenju vodnih osličkov. Zaradi tega načina merjenja so naši podatki o teh parametrih diskretni in dinamike fizikalnih in kemijskih parametrov na naših lokacijah ne poznamo točno. Tako iz izmerjenih podatkov lahko sklepamo o razmerah na lokacijah le v grobem. Za natančnejše poznavanje razmer na lokacijah bi morali namestiti merilce, ki bi zajemali podatke pogosteje in daljši čas.

### 5.2 SPOLNA SESTAVA VZORČENIH ŽIVALI

Poleti in jeseni smo na večini lokacij (z izjemo poletnega vzorčenja v Postojni) ujeli bistveno več samcev kot samic, kar se ne sklada z navedbami v literaturi. Ridley in Thompson (1979) poročata, da sta pri vzorčenju vodnih osličkov v Združenem kraljestvu vedno ulovila večji delež samic kot samcev. Steel (1961) poroča, da je razmerje med spoloma večino leta približno 1:1 in da spomladi samice celo prevladujejo. Ker spomladi nismo določali spola, tega ne moremo preveriti. Naš način vzorčenja je bil zelo podoben njihovemu, razen v Planinski jami. Možno je, da smo v Planinski jami zajeli večje število samcev zato, ker smo živali nabirali ročno makroskopsko; nezavedno smo najverjetneje izbirali samce, ki so večji in aktivnejši od samic. Ridley in Thompson (1979) namreč poročata, da se pri površinskih vodnih osličkih samice skrivajo v vegetaciji, sploh, ko so ovigere. Možno je, da se tudi

samice jamske podvrste obnašajo podobno in se skrivajo med kamni in v razpokah, zaradi česar smo jih med vzorčenjem morebiti spregledali.

### 5.3 SVEŽA MASA ŽIVALI

Največjo svežo maso živali smo na vseh lokacijah izmerili spomladi, poleti in jeseni so bile sveže mase bistveno nižje. To se sklada z ugotovitvijo Steel (1961), ki poroča o prisotnosti večjih živali le od decembra do aprila, kasneje pa naj te ne bi presegale 9 mm. Ridley in Thompson (1979) prav tako navajata manjše osebke od konca pomladi do zime. Razlike v masi osebkov, ki smo jih nabrali v različnih letnih časih, so torej verjetno posledica različnih generacij, ki jih vzorčimo tekom leta. Spomladansko generacijo, ki je prezimila in vključuje največje osebke, zamenjata poletna in nato jesenska generacija, v katerih so manjše živali (Steel, 1961; Økland, 1978). Zato zaključujemo, da smo tekom raziskave verjetno merili biomarkerje pri treh različnih generacijah: (i) pomladni generaciji, ki je prezimila in sestoji iz večjih osebkov; (ii) generaciji, ki se je izlegla spomladi in smo jo vzorčili poleti, ter (iii) generaciji, ki se je izlegla poleti in smo jo nabrali jeseni. Slednja najbrž vključuje tudi iz osebke pomladne generacije, saj smo v nekaterih primerih našli bistveno večje osebke (osamelce v naših analizah). Tudi Štrus in Blejec (1983) navajata, da se poletna in jesenska generacija med seboj mešata, ker razmnoževanje poteka od začetka pomladi do jeseni.

Podatkov o razmnoževanju jamskih vodnih osličkov nismo našli. Vendar kaže, da jamske vrste rakov ohranjajo cirkarične (letne) ritme, ki uravnavajo tudi razmnoževanje (Jegla in Poulson, 1970; Dickson in Holsinger; 1981). Tudi v Planinski jami je bila sveža masa osebkov spomladanskega vzorčenja višja od ostalih dveh vzorčenj, vendar je razlika manjša kot pri površinskih lokacijah, kar bi lahko bila posledica stabilnih razmer v jami (Culver in Pipan, 2009).

Med spoloma nismo ugotovili značilnih razlik v masi, razen poleti v Postojni. Predvsem so bili naši vzorci premajhni za tovrstne analize, saj bi v primeru večjega števila živali lahko bili statistični testi bolj natančni. Samci so po podatkih v povprečju večji kot samice v enakem obdobju (Steel, 1961; Ridley in Thompson, 1979).

#### 5.4 AKTIVNOST AChE

Vrednosti aktivnosti AChE površinskih vodnih osličkov (povprečna vrednost  $13.19 \pm 0.51$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>; glej Preglednico 2) so podobne vrednostim, o katerih za kopenske enakonožne rake *Porcellio dilatatus* poročajo Ribeiro in sod. (1999) (povprečje odraslih:  $13.35 \pm 2.52$  SD nmol/min/mg<sub>prot</sub>) in Engenheiro in sod. (2005) ( $\approx 6.3$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>). Vrednosti, o katerih poročajo Ferreira in sod. (2010) za *Porcellionides pruinosus* so 4-krat višje ( $52.05 \pm 6.78$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>), čeprav so še v istem velikostnem razredu. Xuereb in sod. (2009a) poročajo o vrednosti aktivnosti AChE pri postranicah *Gammarus fossarum* ( $\approx 50\text{--}70$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>), ki so 2- do 5-krat višje od naših vrednosti. Ostale vrednosti aktivnosti AChE iz literature so prikazane v Preglednici 2.

Podzemni vodni oslički imajo v vseh treh letnih časih nižje aktivnosti AChE ( $3.73 \pm 0.25$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>) od površinskih ( $13.19 \pm 0.51$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>). Vrednosti aktivnosti AChE površinskih živali se v letnih časih med seboj ne razlikujejo. Ker je močvirje v Ljubljani poleti presahnilo, nimamo vrednosti za to obdobje. Menimo, da bi bil lahko možen razlog za nižjo aktivnost AChE pri podzemnih vodnih osličkih njihova manjša lokomotorna aktivnost. Ta je namreč značilna za številne podzemne nevretenčarje (Hervant in sod., 1997a; Hervant in sod., 1997b). Ker je encimska aktivnost neposredno povezana z lokomotorno aktivnostjo nevretenčarjev (Xuereb in sod., 2009b; Engenheiro in sod., 2005; Jensen in sod., 1997) je možno, da imajo podzemni vodni oslički nižjo aktivnost AChE, če se zaradi ohranjanja energije manj premikajo. Lokomotorne aktivnosti jamskih vodnih osličkov doslej še niso analizirali.

Aktivnosti AChE vodnih osličkov iz Planinske jame in Postojne se med letnimi časi ne razlikujejo, v Jakovici in Ljubljani pa so poletne in jesenske aktivnosti AChE značilno višje od spomladanskih. Pri višjih poletnih temperaturah vode smo opazili tudi večjo varianco aktivnosti v Postojni in Jakovici. Temperatura ima lahko vpliv na aktivnost AChE določenih rakov (Cailleaud in sod., 2006; Menezes in sod., 2006) in mehkužcev (Robillard in sod., 2003; Vidal in sod., 2002), vendar vpliv temperature ni vedno značilen (Xuereb in sod., 2009a). Pri morski kozici *Crangon crangon* so bile poletne in jesenske vrednosti AChE prav tako značilno višje od zimskih in spomladanskih (Quintaneiro in sod., 2006). Za vodnega oslička še ni objav, ki bi obravnavale vpliv temperature na aktivnost AChE. Glede na naše rezultate sklepamo, da so temperatura in ostali sezonsko pogojeni okoljske dejavniki vplivali na aktivnost AChE.

Nismo opazili, da bi bila aktivnost AChE odvisna od spola vodnih osličkov. To je v skladu z raziskavami Xuereb in sod. (2009a), Forget in sod. (2003) in Ribeiro in sod. (1999), ki navajajo, da niso odkrili učinka spola na aktivnost AChE. Glede na majhen vzorec vseeno predlagamo nadaljne raziskave, s katerimi bi natančno proučili vpliv spola na aktivnost AChE.

**Preglednica 2:** Pregled vrednosti aktivnosti AChE izbranih vrst rakov iz literature. Naše vrednosti so prikazane kot povprečje za tri površinske in posebej za podzemno populacijo, s standardno napako. SE; standardna napaka, SD = standardna deviacija,  $\approx$  = vrednosti so odčitane iz grafov ali so preračunane, nmol/min/mg<sub>prot</sub> = nanomoli produkta na minuto na mg proteina.

| vrsta   | aktivnost AChE<br>[nmol/min/mg <sub>prot</sub> ] | del telesa    | referenca                 |
|---|--|---------------|---------------------------|
| <i>Asellus aquaticus</i> -<br>površinski        | 13.19 ± 0.51 SE                                  | celotna žival | Naši podatki              |
| <i>Asellus aquaticus</i><br><i>cavernicolus</i> | 3.73 ± 0.25 SE                                   | celotna žival | Naši podatki              |
| <i>Porcellionides pruinosus</i>                 | 52.05 ± 6.78 SE                                  | glava         | Ferreira in sod., 2010    |
| <i>Porcellio dilatatus</i>                      | 13.35 ± 2.52 SD                                  | glava         | Ribeiro in sod., 1999     |
| <i>Porcellio dilatatus</i>                      | ≈6.3   | glava         | Engenheiro in sod., 2005  |
| <i>Gammarus fossarum</i>                        | ≈50-70   | celotna žival | Xuereb in sod., 2009a     |
| <i>Crangon crangon</i>                          | ≈44  | glavoprsje    | Menezes in sod., 2006     |
| <i>Crangon crangon</i>                          | ≈20  | glavoprsje    | Quintaneiro in sod., 2006 |

## 5.5 AKTIVNOST GST

Vrednosti aktivnosti GST, ki smo jih izmerili ( $57.98 \pm 2.18$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>; glej Preglednico 3), so 7.5-krat manjše od tiste, ki jo za vodnega oslička navaja Dierickx (1984) (437 nmol/min/mg<sub>prot</sub>). Ferreira in sod. (2010) za kopenskega enakonožnega raka *Porcellionides pruinosus* navajajo vrednost, ki je 2-krat višja od naše ( $119.47 \pm 12.15$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>). Aktivnosti GST postranic *Pallasea cancelloides*, *Eulimnogammarus verrucosus* in *Gammarus lacustris* ( $\approx 140$ ,  $\approx 95$  in  $\approx 120$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>) so prav tako višje od naših (Timofeyev, 2006). Ostale vrednosti za primerjavo aktivnosti GST iz literature se nahajajo v Preglednici 3.

Pri vodnih osličkih iz Planinske jame smo izmerili najnižje aktivnosti GST ( $29.63 \pm 1.42$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>), le spomladi so imele podobno aktivnost živali iz Jakovice ( $30.04 \pm 0.95$  nmol/min/mg<sub>prot</sub>). Oslički iz površinskih lokacij so imeli praviloma višjo aktivnost GST kot jamski. Domnevamo, da je aktivnost GST povezana z metabolno aktivnostjo oz. temperaturo, kot opisuje Lushchak (2011). Podzemne živali imajo na splošno nižjo stopnjo metabolizma kot površinske (Hervant in sod., 1997a; Simčič in sod., 2005; Simčič in Brancelj, 2007; Wilhelm in sod., 2006). Poleg tega je bila temperatura vode v Planinski jami tekem vzorčenja najstabilnejša (Preglednica 1). Kombinacija teh dveh faktorjev je bila verjetno razlog za nižjo aktivnost GST v Planinski jami čez celo leto.

Berra in sod. (2004) poročajo o sezonsko variabilni aktivnosti GST v različnih vodnih nevretenčarjih, kjer se pri nekaterih vrstah aktivnost poviša poleti, vendar vzorci niso enotni. Poleti smo na površinskih lokacijah izmerili mnogo višje temperature vode, kar bi lahko bil razlog za višje aktivnosti GST v Postojni in Jakovici v tem obdobju, saj je metabolna



aktivnost živali višja pri višji temperaturi (Lushchak, 2011). Ker je v Ljubljani poleti močvirje presahnilo, podatkov za to obdobje nimamo. Cailleaud in sod. (2006) in Bocchetti in sod. (2006) poročata o vplivu sezone zaradi sprememb temperature na vrsti *Eurytemora affinis* in *Mytilus galloprovincialis*. Glede na naše rezultate sklepamo, da je temperatura vplivala na aktivnost GST, ne izključujemo pa tudi vplivov ostalih sezonsko pogojenih okoljskih dejavnikov.

Med spoloma nismo opazili značilnih razlik v aktivnosti GST, vendar pa je bil naš vzorec živali premajhen za zaključke v zvezi s tem, zato predlagamo nadaljne raziskave, s katerimi bi natančno proučili vpliv spola na GST. V literaturi nismo

**Preglednica 3:** Pregled vrednosti aktivnosti GST izbranih vrst rakov iz literature. Naše vrednosti so prikazane kot povprečje za tri površinske in posebej za podzemno populacijo, s standardno napako. SE; standardna napaka,  $\approx$  = vrednosti so odčitane iz grafov ali so preračunane, nmol/min/mg<sub>prot</sub> = nanomoli produkta na minuto na mg proteina.

| vrsta   | aktivnost GST<br>[nmol/min/mg <sub>prot</sub> ] | del telesa      | referenca                 |
|---|---|-----------------|---------------------------|
| <i>Asellus aquaticus</i> -<br>površinski        | 57.98 ± 2.18 SE                                 | celotna žival   | Naši podatki              |
| <i>Asellus aquaticus</i><br><i>cavernicolus</i> | 29.63 ± 1.42 SE                                 | celotna žival   | Naši podatki              |
| <i>Asellus aquaticus</i>                        | 437   | celotna žival   | Dierickx, 1984            |
| <i>Porcellionides pruinosus</i>                 | 119.47 ± 12.15 SE                               | telo brez glave | Ferreira in sod., 2010    |
| <i>Porcellio scaber</i>                         | ≈1400   | celotna žival   | Drobne in sod., 2008      |
| <i>Pallasea cancelloides</i>                    | ≈140  | celotna žival   | Timofeyev, 2006           |
| <i>Eulimnogammarus</i><br><i>verrucosus</i>     | ≈95   | celotna žival   | Timofeyev, 2006           |
| <i>Gammarus lacustris</i>                       | ≈120  | celotna žival   | Timofeyev, 2006           |
| <i>Crangon crangon</i>                          | ≈6  | abdomen         | Menezes in sod., 2006     |
| <i>Crangon crangon</i>                          | ≈10   | abdomen         | Quintaneiro in sod., 2006 |
| <i>Artemia salina</i>                           | 57.6  | celotna žival   | Stenersen in sod., 1987   |
| <i>Oniscus asellus</i>                          | 67.2  | celotna žival   | Stenersen in sod., 1987   |
| <i>Eupagurus bernardus</i>                      | 50.8  | celotna žival   | Stenersen in sod., 1987   |

## 5.6 KOLIČINA LIPIDOV

Količine lipidov, ki smo jih izmerili pri površinskih vodnih osličkih iz štirih lokacij v treh letnih časih ( $17.12 \pm 1.73 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ; glej Preglednico 4), so primerljive s količinami, ki jih navajajo Ferreira in sod. (2010) za vrsto *Porcellionides pruinosus* ( $21.47 \pm 1.79 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ) in Engenheiro in sod. (2005) za vrsto *Porcellio dilatatus* ( $\approx 26 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ). Ostali podatki za količine lipidov iz literature se nahajajo v Preglednici 4.

Jamski vodni oslički so imeli glede na površinske spomladi nekoliko več lipidov, poleti in jeseni pa manj. Najvišje vrednosti so imeli vodni oslički spomladi v Postojni, poleti v Jakovici in jeseni v Ljubljani. Naši rezultati ne kažejo očitnega trenda večje količine založnih snovi pri jamskih živalih. Nasprotno sta ugotovila Hervant in Renault (2002), ki sta pri troglomorfem enakonožnem raku *Stenasellus virei* ugotovila večjo količino založnih trigliceridov kot pri *A. aquaticus*. Če primerjamo povprečno količino lipidov površinskih ( $17.12 \pm 1.73 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ) in podzemnih živali ( $8.87 \pm 0.95 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ) celo opazimo, da je povprečna vrednost jamskih osličkov nižja. Povprečna vrednost površinskih je višja predvsem na račun višjih poletnih in jesenskih vrednosti.

Pri vodnih osličkih iz Planinske jame in Postojne se količina lipidov med letnimi časi ni značilno razlikovala. V Jakovici smo izmerili višje vrednosti poleti in v Ljubljani jeseni. Sroda in Cossu-Leguille (2011) ter Gismondi in sod. (2012) poročajo o sezonski dinamiki za postranico *Gammarus roeseli*, ki ima manjšo količino lipidov spomladi in poleti ter višjo novembra pri samcih in januarja pri samicah.

Med samci in samicami nismo opazili značilnih razlik v količini lipidov. Razlog za to so najverjetneje premajhni vzorci samic, da bi bili statistični testi značilni. Sroda in Cossu-Leguille (2011) ter Gismondi in sod. (2012) navajajo, da vsebujejo samice *G. roeseli* večje količine lipidov kot samci. Tega nismo potrdili, je pa tak trend opazen tudi pri vodnih osličkih.

**Preglednica 4:** Pregled vrednosti količine lipidov izbranih vrst rakov iz literature. Naše vrednosti so prikazane kot povprečje za tri površinske in posebej za podzemno populacijo, s standardno napako. SE; standardna napaka,  $\approx$  = vrednosti so odčitane iz grafov ali so preračunane,  $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ;  $\mu\text{g}$  lipidov na mg sveže mase živali.

| vrsta                                 | lipidi [ $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ] | opombe           | referenca                |
|---------------------------------------|--|------------------|--------------------------|
| <i>Asellus aquaticus</i> - površinski | $17.12 \pm 1.73$ SE                            | /                | Naši podatki             |
| <i>Asellus aquaticus cavernicolus</i> | $8.87 \pm 0.95$ SE                             | /                | Naši podatki             |
| <i>Porcellionides pruinosus</i>       | $21.47 \pm 1.79$ SE                            | /                | Ferreira in sod., 2010   |
| <i>Porcellio scaber</i>               | $\approx 2.3$                                  | juvenilni osebki | Stanek in sod., 2006     |
| <i>Porcellio scaber</i>               | $\approx 0.9$                                  | /                | Stanek in sod., 2006     |
| <i>Porcellio dilatatus</i>            | $\approx 26$                                   | /                | Engenheiro in sod., 2005 |
| <i>Porcellio dilatatus</i>            | $\approx 70$                                   | /                | Ribeiro in sod., 2001    |

## 5.7 KOLIČINA OGLJIKOVIH HIDRATOV

Količine ogljikovih hidratov, ki smo jih izmerili pri površinskih vodnih osličkih ( $15.21 \pm 0.68 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ; glej Preglednico 5), so primerljive z vrednostjo, ki jo navajajo Ferreira in sod. (2010) za vrsto *Porcellionides pruinosus* ( $9.30 \pm 2.02 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ) ter vrednostmi, ki jih navajajo Ribeiro in sod. (2001) in Engenheiro in sod. (2005) za vrsto *Porcellio dilatatus* ( $\approx 9.5$  in  $\approx 22 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ). Ostali podatki za količino ogljikovih hidratov iz literature se nahajajo v Preglednici 5.

Spomladi nismo opazili značilnih razlik v količini ogljikovih hidratov med lokacijami, poleti so imeli najvišjo količino ogljikovih hidratov vodni oslički v Postojni in jeseni v Ljubljani. Tako kot pri lipidih, tudi pri količini ogljikovih hidratov vodni oslički iz Planinske jame niso izstopali z višjimi količinami, čeprav bi to, glede na podatke Hervant in Renault (2002), za troglomorfne živali pričakovali.

Iz Slike 21 je razvidno, da je bila v Planinski jami, Postojni in Jakovici količina ogljikovih hidratov pri vodnih osličkih nižja poleti in jeseni, čeprav vse razlike med skupinami niso značilne. V Ljubljani je količina jeseni rahlo narastla, vendar razlika ni bila statistično značilna. To se delno sklada z najdbami Gismondi in sod. (2012), ki navajajo, da imajo samice *Gammarus roeseli* največjo količino ogljikovih hidratov decembra in najmanjšo oktobra. Samci v njihovi študiji so imeli največjo količino ogljikovih hidratov prav tako decembra, najmanjšo pa marca.

Med spoloma nismo opazili značilnih razlik znotraj letnega časa in lokacije. Gismondi in sod. (2012) navajajo, da imajo samice *G. roeseli* več založnih snovi v obliki glikogena kot samci. Zaradi majhnega vzorca samic razlike med spoloma pri vodnem osličku niso značilne, tudi kadar je trend opazen (Slika 22).

**Preglednica 5:** Pregled vrednosti količine ogljikovih hidratov izbranih vrst rakov iz literature. Naše vrednosti so prikazane kot povprečje za tri površinske in posebej za podzemno populacijo, s standardno napako. SE; standardna napaka,  $\approx$  = vrednosti so odčitane iz grafov ali so preračunane,  $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ;  $\mu\text{g}$  ogljikovih hidratov na mg sveže mase.

| vrsta                                 | oglj. hidr.<br>[ $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ] | opombe           | referenca                |
|---------------------------------------|--|------------------|--------------------------|
| <i>Asellus aquaticus</i> - površinski | $15.21 \pm 0.68$ SE                                    | /                | Naši podatki             |
| <i>Asellus aquaticus cavernicolus</i> | $11.99 \pm 0.94$ SE                                    | /                | Naši podatki             |
| <i>Porcellionides pruinosus</i>       | $9.30 \pm 2.02$ SE                                     | /                | Ferreira in sod., 2010   |
| <i>Porcellio scaber</i>               | $\approx 2.1$  | juvenilni osebki | Stanek in sod., 2006     |
| <i>Porcellio scaber</i>               | $\approx 0.9$  | /                | Stanek in sod., 2006     |
| <i>Porcellio dilatatus</i>            | $\approx 9.5$  | /                | Ribeiro in sod., 2001    |
| <i>Porcellio dilatatus</i>            | $\approx 22$   | /                | Engenheiro in sod., 2005 |
| <i>Gammarus roeseli</i>               | $\approx 3.03$   | samci            | Gismondi in sod., 2012   |
| <i>Gammarus roeseli</i>               | $\approx 3.83$   | samice           | Gismondi in sod., 2012   |

## 5.8 KOLIČINA PROTEINOV

Vrednosti količine proteinov pri površinskih vodnih osličkih ( $101.76 \pm 3.38 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ; glej Preglednico 6) so v intervalu vrednosti, ki jih navajajo Stanek in sod. (2006) za *Porcellio scaber* ( $\approx 58 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ) in Engenheiro in sod. (2005) za *Porcellio dilatatus* ( $\approx 180 \mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ). Ostali podatki za količino proteinov iz literature se nahajajo v Preglednici 6.

Spomladi so imeli vodni oslički iz Planinske jame večjo količino proteinov kot površinski. Poleti značilnih razlik med lokacijami ni bilo, jeseni pa je bila količina največja pri tistih iz Postojne. Hervant in Renault (2002) za troglomorfne enakonožne rake navajata približno enako količino proteinov kot za površinske. Naše povprečne vrednosti površinskih in podzemnih vodnih osličkov se prav tako ne razlikujejo bistveno.

Čeprav vse razlike niso statistično značilne, lahko na Sliki 24 opazimo, da je bila količina proteinov poleti in jeseni višja kot spomladi. O podobni sezonski dinamiki poročata Sroda in Cossu-Leguille (2011) za postranico *Gammarus roeseli*. Najvišjo količino proteinov navajata za jesen in zimo, najnižjo pa za poletje. Mi smo izmerili najnižje količine proteinov spomladi. Domnevamo, da so imele živali spomladi najmanjšo količino proteinov zaradi stradanja čez zimo, poleti in jeseni pa se konzumacija listov poveča, čemur sledi povečanje količine proteinov.

Med spoloma znotraj letnega časa in lokacije nismo opazili značilnih razlik. Sroda in Cossu-Leguille (2011) pri samicah *G. roeseli* poročata o višjih količinah proteinov kot v samcih. Tak trend se kaže tudi v našem primeru (zlasti poleti, jeseni pa ne na vseh lokacijah), vendar je bil vzorec samic premajhen za natančne teste.

**Preglednica 6:** Pregled vrednosti količine proteinov izbranih vrst rakov iz literature. Naše vrednosti so prikazane kot povprečje za tri površinske in posebej za podzemno populacijo, s standardno napako. SE; standardna napaka,  $\approx$  = vrednosti so odčitane iz grafov ali so preračunane,  $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ;  $\mu\text{g}$  proteinov na  $\text{mg}$  sveže mase.

| vrsta                                 | proteini<br>[ $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ] | opombe           | referenca                |
|---------------------------------------|---|------------------|--------------------------|
| <i>Asellus aquaticus</i> - površinski | $101.76 \pm 3.38$ SE                                | /                | Naši podatki             |
| <i>Asellus aquaticus cavernicolus</i> | $105.16 \pm 4.87$ SE                                | /                | Naši podatki             |
| <i>Porcellionides pruinosus</i>       | $39.17 \pm 1.60$ SE                                 | /                | Ferreira in sod., 2010   |
| <i>Porcellio scaber</i>               | $\approx 53$  | juvenilni osebki | Stanek in sod., 2006     |
| <i>Porcellio scaber</i>               | $\approx 58$  | /                | Stanek in sod., 2006     |
| <i>Porcellio dilatatus</i>            | $\approx 450$                                       | /                | Ribeiro in sod., 2001    |
| <i>Porcellio dilatatus</i>            | $\approx 180$                                       | /                | Engenheiro in sod., 2005 |

## 5.9 ENCIMSKA AKTIVNOST IN ZALOŽNE SNOVI KOT BIOMARKERJI

Za uspešno uporabo biomarkerjev v ekotoksikoloških poskusih je potrebno razumevanje okoljskih in endogenih vplivov na biomarkerje in naravno dinamiko biomarkerjev ter poznavanje značilnosti živali in njene občutljivosti na onesnažila. Samo z uporabo prave metodologije, izbiro ustreznega modelnega organizma in pravilno interpretacijo podatkov, so biomarkerji lahko zanesljivi pokazatelji stanja v naravi (Jemec in sod., 2010; Xuereb in sod., 2009a; Handy in sod., 2003; Domingues in sod., 2010; Van Gestel in Van Brummelen, 1996).

Vrednosti biomarkerjev, ki smo jih merili, so se sezonsko razlikovale. Vpliv letnega časa je pomemben, saj se z njim spreminjajo številni dejavniki v okolju živali. Naše meritve fizikalnih in kemijskih parametrov v okolju se ravno tako spreminjajo sezonsko (Preglednica 1). Temperatura vode je bila močno sezonsko pogojena. Razlika med najmanjšo in največjo vodno temperaturo, ki smo jo izmerili na dveh lokacijah, je bila 20,7 °C (Postojna in Jakovica), največja izmerjena temperaturna razlika v Planinski jami je 3,8 °C. Tovrstne razlike smo pričakovali, saj so jame okolje, kjer temperatura malo niha (Culver in Pipan, 2009). Temperatura okolja vpliva na številne procese v živalih in lahko vpliva na biomarkerje. Raziskave kažejo, da so pri višji temperaturi vrednosti aktivnosti AChE in GST višje (Cailleaud in sod., 2006; Menezes in sod., 2006; Robillard in sod., 2003; Vidal in sod., 2002; Lushchak, 2011; Bocchetti in sod., 2006). V naših podatkih so encimske aktivnosti načeloma višje pri višjih temperaturah vode, kar se z navedbami sklada. Prav tako glede na temperaturo okolja niha količina založnih snovi v živalih (Gismondi in sod., 2012; Sroda in Cossu-Leguille, 2011; Dutra in sod., 2007). Temperatura vode vpliva na razmnoževanje vodnega oslička (Štrus in Blejec, 1983; Økland, 1978; Andersson, 1969), kar verjetno lahko vpliva na količino založnih snovi, kot je znano pri nekaterih rakah (Plaistow in sod., 2003; Sparkes in sod., 1996; Jormalainen in sod., 2001). Sezonske razlike smo opazili tudi v drugih izmerjenih okoljskih parametrih, vendar njihov vpliv na biomarkerje ni dobro poznan.

Vrednosti posameznega biomarkerja so imele različne sezonske trende po lokacijah; znotraj istega letnega časa so se vrednosti iz posameznih lokacij razlikovale. Razlike med trendi biomarkerjev pri površinskih lokacijah so bile verjetno posledica specifičnih pogojev na posameznih lokacijah. Pri tem vpliva okolja posamezne lokacije in vzorčene podvrste ne moremo ločiti, saj smo na treh lokacijah vzorčili dve različni podvrsti. Domnevamo, da so bile različne razmere na lokacijah vzrok za različne razmnoževalne cikle vodnih osličkov, ki imajo pomemben vpliv na količino založnih snovi (Plaistow in sod., 2003; Sparkes in sod., 1996; Jormalainen in sod., 2001; Sroda in Cossu-Leguille, 2011; Gismondi in sod., 2012; Dutra in sod., 2007). Na primer: vrednosti lipidov poleti v Postojni niso značilno višje od pomladnih (Slika 18), ker smo mogoče vzorčili po vrhuncu predvidenega poletnega razmnoževanja, ko so morebiti živali porabile del založnih snovi za razmnoževanje. V Jakovici pa so poleti vrednosti lipidov značilno višje (Slika 18), ker smo mogoče vzorčili pred vrhuncem razmnoževanja in so imele morebiti živali še nakopičene založne snovi.

Živali namreč lahko nakopičene založne snovi porabljajo s paritvenim vedenjem, med katerim samci prenašajo samico in se hkrati manj hranijo (Plaistow in sod., 2003; Sparkes in sod., 1996; Jormalainen in sod., 2001). Zrele samice rakov kopičijo lipide za vitelogenezo (Rosa in Nunez, 2002). Založne snovi raki porabijo tudi za gametogenezo, inkubacijo jajc ter skrb za zarod (Oliveira in sod., 2007; Dutra in sod., 2007). Po visoki količini lipidov in ogljikovih hidratov je v jesenskem času odstopala populacija iz močvirja v Ljubljani, ki je čez poletje presahnilo. Izsušitev je verjetno povzročila motnjo v razmnoževanju, jesenski razmnoževalni vrh se je mogoče pomaknil v poznejši čas ali pa se živali sploh niso parile in založnih snovi niso porabile.

Sezonske razlike v biomarkerjih so bile pri jamskih vodnih osličkih manjše kot pri površinskih, prav tako imajo vrednosti biomarkerjev jamskih osebkov manjšo varianco. Vrednosti encimskih biomarkerjev (aktivnost AChE in GST) jamskih osebkov so bile nižje od površinskih. Več avtorjev navaja vpliv temperature na vrednost encimskih biomarkerjev (Cailleaud in sod., 2006; Menezes in sod., 2006; Robillard in sod., 2003; Vidal in sod., 2002; Bocchetti in sod., 2006; Lushchak, 2011). Zaradi stabilnih temperatur v Planinski jami domnevamo, da so vrednosti encimskih biomarkerjev jamskih osebkov bolj stabilne. Prav tako je ena od tipičnih prilagoditev jamskih živali nižja stopnja metabolizma (Hervant in sod., 1997a; Simčič in sod., 2005; Simčič in Brancelj, 2007; Wilhelm in sod., 2006), ki verjetno prav tako vpliva na vrednosti encimskih biomarkerjev jamskih živali. Nasprotno pa razlik v količini založnih snovi med jamskimi in površinskimi osebkami nismo ugotovili, čeprav so površinski lahko dosegali višje količine založnih snovi. Domnevamo, da je to posledica stabilnih temperatur v jami in prehranskih razmer, ki verjetno niso bile bistveno slabše od površinskih. Culver in Poulson (1971) namreč poročata, da se stopnja metabolizma treh ekotipov *G. minus* (en jamski in dva površinska) ne razlikuje od stopnje metabolizma dveh ekotipov sorodnega rodu *Stygonectes* (jamski in površinski), saj ni bilo razlik v količini hrane med površinskimi in jamskima habitatoma.

Neznan faktor, ki bi lahko vplival na vrednosti merjenih biomarkerjev, so različni ksenobiotiki (Xuereb in sod., 2009b; Jensen in sod., 1997; Ribeiro in sod., 1999; Ribeiro in sod., 2001; Engenheiro in sod., 2005; Stanek in sod., 2003; Stanek in sod., 2006; Dierickx, 1984; Jemec in sod., 2008; Drobne in sod., 2008; Verslycke in sod., 2004) in/ali odpadne vode (O'Neill in sod., 2004), vendar v naši raziskavi nismo proučevali onesnažil. Vplivi onesnažil niso izključeni, saj vodni oslički niso živeli v kontroliranem okolju, temveč smo jih vzorčili blizu naselij. Pivka teče skozi Postojno, v Planinsko jamo se steka voda tudi od drugod, Unico pri Jakovici obdajajo travniki kmetij in močvirje je na robu Ljubljane. Z merjenjem *in situ* vrednosti biomarkerjev v nekontroliranem okolju smo v dobljene vrednosti vnesli tudi nekaj negotovosti, saj vseh okoljskih vplivov nismo mogli ne zajeti in ne predvideti. Kljub temu so tovrstne študije pomembne za načrtovanje prihodnjih poskusov, pridobivanje referenčnih vrednosti in vrednotenje uporabnosti biomarkerjev (Jemec in sod., 2010; Xuereb in sod., 2009a; Handy in sod., 2003; Domingues in sod., 2010; Van Gestel in Van Brummelen, 1996).

Ker so torej izmerjene vrednosti biomarkerjev vodnih osličkov časovno in krajevno variabilne, se tu pojavi problematika pridobivanja referenčnih vrednosti. Vsekakor ne moremo izbrati ene same bazalne (referenčne) vrednosti biomarkerjev (s čimer v tem delu označujemo vrednosti, ki niso modulirane z onesnažili), saj se med populacijami lahko vrednosti v danem okolju močno razlikujejo. Za referenčne vrednosti bi bila zato po našem mnenju primernejša »referenčna krivulja«, ki bi prikazovala sezonsko nihanje biomarkerja glede na lokacijo. Bolj prilagodljiv bi bil model, ki bi lahko predvideval vrednosti biomarkerja glede na okoljske dejavnike. Vprašljivo pa je ali bi ob množici povezanih in spremenljivih okoljskih vplivov lahko zares proizvedli zanesljiv model.

Za primerljivost podatkov bi bila po našem mnenju prav tako pomembna enotna metodologija. Zaradi različne metodologije meritev in prikaza vrednosti biomarkerjev (glej Preglednice 2–6), se namreč sprašujemo o primerljivosti podatkov. Standardizacija postopkov bi verjetno izboljšala primerljivost vrednosti biomarkerjev vsaj za iste vrste iz različnih raziskav. Priporočljiva bi bila uporaba enake metodologije priprave vzorcev in merjenja vrednosti, enotna velikost, starost ter spol testnih organizmov, upoštevanje okoljskih dejavnikov, uporaba enake enote za izražanje biomarkerja in pravilna interpretacija vrednosti (Jemec in sod., 2010).

Domnevamo, da sta nihanje vrednosti biomarkerjev vodnega oslička med letnimi časi in njihova varianca, v Planinski jami, manjša predvsem zaradi stabilnejše temperature v jamah kot na površju (Culver in Pipan, 2009). Jamske populacije *A. aquaticus* bi bile zato lahko primernejše za ekotoksikološke študije kot površinske. Predvsem aktivnosti AChE in GST bi bile lahko, glede na stabilne vrednosti in neodvisnost od spola in razmnoževanja, primerne kot zanesljiv pokazatelj fiziološkega stanja vodnih osličkov. Žal pa ne poznamo občutljivosti jamskih vodnih osličkov na onesnažila in ne vemo ali so vrednosti biomarkerjev ostalih jamskih populacij vodnega oslička prav tako stabilne. Problematičen bi lahko bil tudi vpliv periodičnega izlova jamskih živali iz narave. Zaradi slabega poznavanja populacijske dinamike bi bile potrebne raziskave tudi na tem področju. Ob nadaljnih raziskavah okoljskih vplivov na biomarkerje bi bila možna presoja ustreznosti vodnega oslička kot modelnega organizma v ekotoksikologiji.

## 6 SKLEPI

Ugotovitve na podlagi primerjave biomarkerjev vodnih osličkov iz različnih letnih časov in lokacij lahko strnemo v naslednje sklepe:

- Vrednosti aktivnosti AChE in GST so se razlikovale med letnimi časi. Vendar je bila velikost razlik encimskih aktivnosti med letnimi časi odvisna od okoljskih dejavnikov na posamezni lokaciji.
- Količina založnih snovi se je razlikovala med letnimi časi. Trendi sezonske dinamike so se razlikovali glede na vrsto založne snovi in razlike v količini založnih snovi so bile odvisne od okoljskih dejavnikov.
- Vrednosti aktivnosti AChE in GST jamske podvrste *A. a. cavernicolus* so bile nižje od vrednosti površinskih podvrst, verjetno kot posledica stabilnejših okoljskih razmer v jami.
- Količina založnih snovi se pri jamski podvrsti *A. a. cavernicolus* ni značilno razlikovala od površinskih podvrst. Vseeno so površinske podvrste v nekaterih primerih dosegle višje količine založnih snovi.
- Jamski vodni oslički bi bili primernejši za proučevanje vpliva onesnažil na biomarkerje kot površinski. Predvsem njihove vrednosti encimskih aktivnosti so bile tekom leta stabilnejše in z manjšo varianco kot količina založnih snovi. Problem pa pri jamskih vodnih osličkih lahko predstavlja izlov večjega števila živali, saj njihova številčnost in populacijska dinamika še nista raziskani.
- Potrebni bi bilo več raziskav o biomarkerjih vodnih osličkov *in situ* in povezavah med biomarkerji ter endogenimi in okoljskimi vplivi na biomarkerje.



## 7 POVZETEK

Vodni osliček, *Asellus aquaticus* (Linnaeus, 1758), je evritopa, evritermna in ekspanzivna vrsta. Najdemo ga v različnih površinskih sladkovodnih habitatih, kot tudi v podzemnih vodah (Henry in sod., 1996). V našem delu se srečamo s tremi podvrstami; *A. aquaticus aquaticus* (L.) Racovitza 1919, ki je najbolj široko razširjena podvrsta; *A. aquaticus carniolicus* Sket 1965, najbolj pleziomorfna podvrsta, ki živi na kraških poljih v JZ Sloveniji in *A. aquaticus cavernicolus* Racovitza 1925, najbolj troglomorfna podvrsta, ki je znana iz podzemnih delov reke Pivke in Ljubljanice (Prevorčnik in sod., 2004).

Pojem biomarker Van Gestel in Van Brummelen (1996) definirata kot biokemijske, fiziološke, histološke in morfološke parametre. Več avtorjev pripisuje meritvi biomarkerjev velik potencial kot orodje za zaznavanje onesnaženja preko meritve encimskih aktivnosti (Ferreira in sod., 2015; Carvalho in sod., 2013; Handy in sod., 2003) ali količine založnih snovi (Ribeiro in sod., 2001, Schill in Köhler, 2004; Smolders in sod., 2004; Durou in sod., 2005).

Referenčne vrednosti biomarkerjev za nekatere vrste živali so na voljo (npr. Ferreira in sod., 2010), vendar so pogosto te vrednosti pridobljene iz živali, ki so gojene v laboratorijskih razmerah, kar izključuje okoljske faktorje, ki bi lahko imeli vpliv na biomarkerje. Več avtorjev poroča, da je za zanesljivo uporabo biomarkerjev za zaznavanje onesnažil potrebno poznavanje okoljskih vplivov na biomarkerje in naravno dinamiko biomarkerjev (Jemec in sod., 2010; Xuereb in sod., 2009a; Van Gestel in Van Brummelen, 1996). Samo tako so biomarkerji lahko zanesljivi pokazatelji stanja v naravi.

Magistrsko delo je nastalo z namenom proučevanja sezonske dinamike biomarkerjev v vrsti *A. aquaticus* in primerjave biomarkerjev osebkov različnih podvrst iz različnih lokacij. Merili smo aktivnost dveh encimov (acetilholinesteraza; AChE in glutation-S-transferaza; GST) in količino treh založnih snovi (lipidi, ogljikovi hidrati in proteini). Želeli smo ugotoviti vpliv sezonsko vezanih okoljskih dejavnikov na biomarkerje pri *A. aquaticus*, ugotoviti ali obstajajo razlike v biomarkerjih površinskih in jamskih populacij in podati smernice glede razumevanja bazalnih vrednosti vodnih osličkov ter njihove potencialne uporabe v biomonitoringu.

Rake za meritve biomarkerjev snovi smo vzorčili na štirih lokacijah. Tri se nahajajo vzdolž reke Pivke, ki ponikne v Postojnsko jamo, preko podzemnih sifonov prodre v Planinsko jamo, izvira na vhodu Planinske jame in teče naprej po Planinskem polju kot Unica. Četrta lokacija se nahaja v močvirju na robu Ljubljane. Zajeli smo živali iz treh letnih časov; pomladi, poleti in jeseni. Na vsako vzorčevalno obdobje smo na lokacijo uporabili 15 osebkov za meritve aktivnosti AChE in GST ter meritve vsebnosti proteinov in 15 osebkov za meritve vsebnosti lipidov in ogljikovih hidratov.

Vrednosti biomarkerjev, ki smo jih merili, se sezonsko razlikujejo. Encimske aktivnosti načeloma višje pri višjih temperaturah vode in opazili smo sezonske razlike v količini založnih snovi. Sezonsko se spreminjajo številni dejavniki v okolju živali; predvsem temperatura vode je bila močno sezonsko pogojena. Temperatura okolja vpliva na številne procese v živali in lahko vpliva na biomarkerje (Cailleaud in sod., 2006; Menezes in sod., 2006; Robillard in sod., 2003; Vidal in sod., 2002; Lushchak, 2011; Cailleaud in sod., 2006; Bocchetti in sod., 2006; Gismondi in sod., 2012; Sroda in Cossu-Leguille, 2011; Dutra in sod., 2007; Štrus in Blejec, 1983; Økland, 1978; Andersson, 1969).

Razlike med trendi biomarkerjev na površinskih lokacijah so verjetno posledica specifičnih razmer na posameznih lokacijah. Domnevamo, da je različno okolje na lokacijah vzrok za različne razmnoževalne cikle vodnih osličkov, ki imajo pomemben vpliv za količino založnih snovi (Sroda in Cossu-Leguille, 2011; Gismondi in sod., 2012; Dutra in sod., 2007).

Domnevamo, da so vrednosti encimskih biomarkerjev jamskih osebkov bolj stabilne zaradi stabilnosti temperature in ostalih okoljskih razmer v Planinski jami. Prav tako je ena od tipičnih prilagoditev jamskih živali nižja stopnja metabolizma (Hervant in sod., 1997a; Simčič in sod., 2005; Simčič in Brancelj, 2007), ki verjetno prav tako vpliva na vrednosti encimskih biomarkerjev jamskih živali. Nasprotno pa razlik v količini založnih snovi med jamskimi in površinskimi osebki nismo ugotovili, čeprav so površinske podvrste v nekaterih primerih dosegle višje količine založnih snovi.

Jamske populacije *A. aquaticus* bi bile po našem mnenju, zaradi manjšega vpliva temperature, lahko bolj primerne za nadaljne ekološke in ekotoksikološke študije kot površinske. Predvsem aktivnosti AChE in GST bi lahko glede na stabilne vrednosti in neodvisnost od spola in razmnoževalnega cikla lahko bili primerni kot zanesljiv pokazatelj fiziološkega stanja. Vendar ni znano, kako bi periodičen izlov vplival na naravne populacije jamskih vodnih osličkov.

Še vedno bo potrebno veliko raziskav na področju okoljskih vplivov na biomarkerje, da bo možna njihova uporaba v namene varstva okolja.

## 8 VIRI

- Albalasmeh A. A., Berhe A. A., Ghezzehei T. A. 2013. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 97: 253-261
- Alexis Dinno. 2016. dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.2  
<https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test> (21. 6. 2016)
- Andersson E. 1969. Life-cycle and growth of *Asellus aquaticus* (L.) with special reference to the effects of temperature. Institute for Freshwater research Drottningholm, 49: 5-26
- Angelini C., Baccetti B., Piomboni P., Trombino S., Aluigi M.G., Stringara S., Gallus L., Falugi C. 2004. Acetylcholine synthesis and possible functions during sea urchin development. *European journal of histochemistry*, 48, 3: 235
- Berra E., Forcella M., Giacchini R., Marziali L., Rossaro B., Parenti P. 2004. Evaluation of enzyme biomarkers in freshwater invertebrates from Taro and Ticino river, Italy. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, 40, 3: 169-180
- Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A Rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917
- Bloor M.C., Banks C.J. 2006. An evaluation of mixed species in-situ and ex-situ feeding assays: The altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*. *Environment international*, 32, 1: 22-27
- Bocchetti R., Regoli F. 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, 65, 6: 913-921
- Bouskill N.J., Handy R.D., Ford T.E., Galloway T.S. 2006. Differentiating copper and arsenic toxicity using biochemical biomarkers in *Asellus aquaticus* and *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 65, 3: 342-349
- Cailleaud K., Maillet G., Budzinski H., Souissi S., Forget-Leray J. 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147, 4: 841-849
- Calow P., Sibly R.M. 1990. A physiological basis of population processes: ecotoxicological implications. *Functional Ecology*, 4, 3: 283-288

- Carvalho S.M., Belzunces L.P., Carvalho G.A., Brunet J.L., Badiou-Beneteau A. 2013. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32, 9: 2117-2124
- Charron L., Geffard O., Chaumot A., Coulaud R., Jaffal A., Gaillet V., Dedourge-Geffard O., Geffard A. 2014. Influence of molting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage in *Gammarus fossarum*. *PloS one*, 9, 4: e96393, doi:10.1371/journal.pone.0096393: 9 str.
- Clark A.G. 1989. The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 92, 3: 419-446
- Cockrell B.J. 1984. Effects of water depth on choice of spatially separated prey by *Notonecta glauca* L. *Oecologia*, 62: 256-261
- Culver D.C., Poulson T.L. 1971. Oxygen consumption and activity in closely related amphipod populations from cave and surface habitats. *American Midland Naturalist*, 74-84
- Culver D.C., Pipan T. 2009. *The biology of caves and other subterranean habitats*. New York, Oxford University Press: 254 str.
- Cummins K.W., Klug M.J. 1979. Feeding ecology of stream invertebrates. *Annual review of ecology and systematics*, 10: 147-172
- Day K.E., Scott I.M. 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicology*, 18, 2: 101-113
- De Coen W.M., Janssen C.R. 2003. The missing biomarker link: Relationships between effects on the cellular energy allocation biomarker of toxicant-stressed *Daphnia magna* and corresponding population characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 7: 1632-1641
- De Lange H.J., Sperber V., Peeters, E.T. 2006. Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environmental toxicology and chemistry*, 25, 2: 452-457
- Dehedin A., Piscart C., Marmonier P. 2013. Seasonal variations of the effect of temperature on lethal and sublethal toxicities of ammonia for three common freshwater shredders. *Chemosphere*, 90, 3: 1016-1022

- Depledge M.H., Fossi M.C. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology*, 3, 3: 161-172
- Dickson G.W., Holsinger J.R. 1981. Variation among populations of the troglobitic amphipod crustacean *Crangonyx antennatus* Packard (Crangonyctidae) living in different habitats, III: population dynamics and stability. *International Journal of Speleology*, 11, 1: 5
- Dierickx P.J. 1984. Glutathione S-transferase in aquatic macro-invertebrates and its interaction with different organic micropollutants. *Science of the total environment*, 40, 1: 93-102
- Domingues I., Agra A.R., Monaghan K., Soares A.M., Nogueira A.J. 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 1: 5-18
- Dowle M., Srinivasan A., Short T., Lianoglou S. with contributions from Saporta R. and Antonyan E. 2015. data.table: Extension of Data.frame. R package version 1.9.6 <https://CRAN.R-project.org/package=data.table> (21.6. 2016)
- Dragulescu A.A. 2014. xlsx: Read, write, format Excel 2007 and Excel 97/2000/XP/2003 files. R package version 0.5.7 <https://CRAN.R-project.org/package=xlsx> (21. 6. 2016)
- Drobne D., Blažič M., Van Gestel C.A., Lešer V., Zidar P., Jemec A., Trebše P. 2008. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*, 71, 7: 1326-1334.
- DuBois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 3: 350-356
- Dunn O. J. 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6, 3: 241-252
- Durou C., Mouneyrac C., Amiard-Triquet C. 2005. Tolerance to metals and assessment of energy reserves in the polychaete *Nereis diversicolor* in clean and contaminated estuaries. *Environmental Toxicology*, 20, 1: 23-31
- Dutra B.K., Castiglioni D.S., Santos R.B., Bond-Buckup G., Oliveira, G.T. 2007. Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148, 1: 239-247

- Ellman L.G., Courtney K.D., Andres Jr. V., Featherstone R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95
- Engenheiro E.L., Hankard P.K., Sousa J.P., Lemos M.F., Weeks J.M., Soares A.M. 2005. Influence of dimethoate on acetylcholinesterase activity and locomotor function in terrestrial isopods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 3: 603-609
- Ferreira N.G., Santos M.J., Domingues I., Calh a C.F., Monteiro M., Amorim M.J., Soares A.M., Loureiro S. 2010. Basal levels of enzymatic biomarkers and energy reserves in *Porcellionides pruinosus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 12: 2128-2136
- Ferreira N.G., Morgado R., Santos M.J., Soares A.M., Loureiro S. 2015. Biomarkers and energy reserves in the isopod *Porcellionides pruinosus*: the effects of long-term exposure to dimethoate. *Science of the Total Environment*, 502: 91-102
- Field A., Miles J., Field Z. 2013. *Discovering statistics using R*. New Delhi, Sage: 947 str.
- Forbes V.E., Calow P. 1996. Costs of living with contaminants: implications for assessing low-level exposures. *Belle Newsletter*, 4, 3: 221-227
- Forbes V.E., Palmqvist A., Bach, L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 1: 272-280
- Forget J., Beliaeff B., Bocquen G. 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, 62, 3: 195-204
- Fossati S.M., Candiani S., N dl M.T., Maragliano L., Pennuto M., Domingues P., Benfenati F., Pestarino M., Zullo, L. 2015. Identification and Expression of Acetylcholinesterase in *Octopus vulgaris* Arm Development and Regeneration: a Conserved Role for ACHE?. *Molecular neurobiology*, 52, 1: 45-56
- Fulton M.H., Key P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1: 37-45
- Gismondi E., Beisel J.N., Cossu-Leguille C. 2012. Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. *Environmental research*, 118: 47-52
- Gowland B.T., Moffat C.F., Stagg R.M., Houlihan D.F., Davies I.M. 2002. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Marine environmental research*, 54, 2: 169-177

- Graca M.A.S., Maltby L., Calow P. 1994. Comparative ecology of *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) I: population dynamics and microdistribution. *Hydrobiologia*, 281, 3: 155-162
- Green D.W., Williams K.A., Pascoe D. 1986. The acute and chronic toxicity of cadmium to different life history stages of the freshwater crustacean *Asellus aquaticus* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 15, 5: 465-471
- Gruner H.E. 1965. *Krebstiere oder Crustacea. Isopoda. V: Die Tierwelt Deutschlands und der angrenzten Meeresteile.* Dahl F. (ur.). Jena, Veb Gustav Fischer Verlag: 148 str.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139
- Halliwell B., Gutteridge J.M. 2015. *Free radicals in biology and medicine.* New York, Oxford University Press: 905 str.
- Handy R.D., Galloway T.S., Depledge M.H. 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, 12, 1-4: 331-343
- Harrell Jr. F.E. (2016). Hmisc: Harrell Miscellaneous. R package version 3.17-3. <https://CRAN.R-project.org/package=Hmisc>, (21.6. 2016)
- Hasu T., Tellervo Valtonen E., Jokela J. 2006. Costs of parasite resistance for female survival and parental care in a freshwater isopod. *Oikos*, 114, 2: 322-328
- Hasu T., Jokela J., Valtonen E.T. 2008. Effects of growth factors and water source on laboratory cultures of a northern *Asellus aquaticus* (Isopoda) population. *Aquatic Ecology*, 42, 1: 141-150
- Henry J.P., Magniez G., Notenboom, J. 1996. Isopoda Asellota de Turquie récoltés en 1987. Netherlands biospeleological explorations in Turkey, 5. *Contributions to Zoology*, 66,1: 55-62
- Hervant F., Mathieu J., Garin D., Freminet A. 1996. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigean isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery. *Physiological Zoology*: 1277-1300
- Hervant F., Mathieu J., Messana G. 1997a. Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and

- subsequent recovery. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 320, 2: 139-148
- Hervant F., Mathieu J., Barré H., Simon K., Pinon C. 1997b. Comparative study on the behavioral, ventilatory, and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 118, 4: 1277-1283
- Hervant F., Mathieu J., Barré H. 1999. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. *Journal of Experimental Biology*, 202, 24: 3587-3595
- Hervant F., Mathieu J., Durand J. 2001. Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *Journal of Experimental Biology*, 204, 2: 269-281
- Hervant F., Renault D. 2002. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *Journal of Experimental Biology*, 205, 14: 2079-2087
- Hojsgaard S., Halekoh U. 2015. doBy: Groupwise Statistics, LSmeans, Linear Contrasts, Utilities. R package version 4.5-14. <https://CRAN.R-project.org/package=doBy> (21.6. 2016)
- Holland D.G. 1976. The distribution of the freshwater Malacostraca in the area of the Mersey and Weaver River Authority. *Freshwater Biology*, 6, 3: 265-276
- Holmstrup M., Sørensen J.G., Overgaard J., Bayley M., Bindesbøl A.M., Slotsbo S., Fisker K.V., Maraldo K., Waagner D., Labouriau R., Asmund G. 2011. Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil. *Environmental pollution*, 159, 1: 190-197
- Hyne R.V., Maher W.A. 2003. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and environmental safety*, 54, 3: 366-374
- Issartel J., Hervant F., Voituron Y., Renault D., Vernon P. 2005. Behavioural, ventilatory and respiratory responses of epigean and hypogean crustaceans to different temperatures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141, 1: 1-7



- Jegla T.C., Poulson T.L. 1970. Circadian rhythms—I. Reproduction in the cave crayfish, *Orconectes pellucidus inermis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 33, 2: 347-355
- Jemec A., Drobne D., Tišler T., Trebše P., Roš M., Sepčič K. 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 144, 4: 303-309
- Jemec A., Drobne D., Remškar M., Sepčič K., Tišler T. 2008. Effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods (*Porcellio scaber*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 9: 1904-1914
- Jemec A., Drobne D., Tišler T., Sepčič K. 2010. Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 3: 571-581
- Jemec A., Lešer V., Drobne D. 2012. The link between antioxidant enzymes catalase and glutathione S-transferase and physiological condition of a control population of terrestrial isopod (*Porcellio scaber*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 79: 42-47
- Jensen C.S., Garsdal L., Baatrup E. 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 8: 1727-1732
- Jormalainen V., Merilaita S., Riihimäki J. 2001. Costs of intersexual conflict in the isopod *Idotea baltica*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14, 5: 763-772
- Jugovic J. 2005. Rasna diferenciacija vodnega oslička, *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
- Karczmar A.G. 2010. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases—a review. *Chemico-biological interactions*, 187,1: 34-43
- Koop J.H., Schäffer M., Ortmann C., Winkelmann C. 2008. Towards environmental assessment of river ecosystems by analyzing energy reserves of aquatic invertebrates. *Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters*, 38, 3: 378-387

- Lattinger-Penko R. 1979. Data on the biology of an underground crustacean, *Asellus aquaticus cavernicolus* Racovitza (Crustacea, Isopoda). *Ekologija*, 14: 83-95
- Leiniö S., Lehtonen K.K. 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140, 3: 408-421
- Lu Y., Park Y., Gao X., Zhang X., Yao J., Pang Y.P., Jiang H., Zhu, K.Y. 2012. Cholinergic and non-cholinergic functions of two acetylcholinesterase genes revealed by gene-silencing in *Tribolium castaneum*. *Scientific reports*, 2: 288
- Lukančič S., Žibrat U., Mezek T., Jerebic A., Simčič T., Brancelj A. 2010. A new method for early assessment of effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* and *Gammarus fossarum*, to pesticides, a laboratory study. *Toxicology and industrial health*, 26, 4: 217-228
- Lushchak V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 101, 1: 13-30
- MacNeil C., Dick J.T.A., Bigsby E., Elwood R.W., Montgomery W.I., Gibbins C.N., Kelly D.W. 2002. The validity of the *Gammarus: Asellus* ratio as an index of organic pollution: abiotic and biotic influences. *Water Research*, 36: 75-84
- Maltby L. 1995. Sensitivity of the crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia: observations and possible mechanisms. *Water Research*, 29, 3: 781-787
- Marcus J.H., Sutcliffe D.W., Willoughby L.G. 1978. Feeding and growth of *Asellus aquaticus* (Isopoda) on food items from the littoral of Windermere, including green leaves of *Elodea canadensis*. *Freshwater Biology*, 8: 505-519
- Mathieu J., Hervant F. 2004. Adaptation: Physiological. V: *Encyclopedia of Caves and Karst Science* (Gunn J., ur.) New York, Fitzroy Dearborn: 1940 str.
- McMurry J. 2016. Organic chemistry. 9<sup>th</sup> edition. Boston, Cengage Learning: 1051 str.
- Menezes S., Soares A.M., Guilhermino L., Peck M.R. 2006. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 335, 1: 114-122
- Migliore L., Paluzzi R., Vitagliano-Tadini G. 1982. Reproductive activity in *Asellus aquaticus* L. (Crustacea, Isopoda) from southern Italy. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 4, 6: 359-367

- Migliore L., de Nicola Giudici M. 1990. Toxicity of heavy metals to *Asellus aquaticus* (L.)(Crustacea, Isopoda). *Hydrobiologia*, 203, 3: 155-164
- Mösslacher F., Creuzé des Châtelliers M. 1996. Physiological and behavioural adaptations of an epigeal and a hypogean dwelling population of *Asellus aquaticus* (L.)(Crustacea, Isopoda). *Archiv für Hydrobiologie*, 138, 2: 187-198
- Nogueira A.J.A., Baird D.J., Soares A.M.V.M. 2004. Testing physiologically-based resource allocation rules in laboratory experiments with *Daphnia magna* Straus. *Annales De Limnologie-International Journal of Limnology*, 40, 4: 257-267
- Nordberg M., Duffus J.H., Templeton D.M. 2004. Glossary of terms used in toxicokinetics (IUPAC Recommendations 2003). *Pure and Applied Chemistry*, 76, 5: 1033-1082.
- Økland K.A. 1978. Life history and growth of *Asellus aquaticus* (L.) in relation to environment in a eutrophic lake in Norway. *Hydrobiologia*, 59, 3: 243-259
- Oliveira G.T., Fernandes F.A., Bueno A.A.P., Bond-Buckup G. 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147, 3: 600-606
- Olsen T., Ellerbeck L., Fisher T., Callaghan A., Crane M. 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* Meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 8: 1725-1732
- O'Neill A.J., Galloway T.S., Browne M.A., Dissanayake A., Depledge M.H. 2004. Evaluation of toxicity in tributaries of the Mersey estuary using the isopod *Asellus aquaticus* (L.). *Marine environmental research*, 58, 2: 327-331
- Pârvulescu L. 2009. The epigeal freshwater malacostracans (Crustacea: Malacostraca) of the rivers in the Anina Mountains (SW Romania). *Studia Universitatis Babeş-Bolyai, seria Biologia*, 54: 3-17
- Plaistow S.J., Bollache L., Cézilly F. 2003. Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. *Animal Behaviour*, 65, 4: 683-691
- Prevorčnik S., Blejec A., Sket B. 2004. Racial differentiation in *Asellus aquaticus* (L.)(Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Archiv für Hydrobiologie*, 160, 2: 193-214

- Printes L.B., Callaghan A. 2003. Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker. *Environmental toxicology and chemistry*, 22, 9: 2042-2047
- Protas M., Jeffery W.R. 2012. Evolution and development in cave animals: from fish to crustaceans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1, 6: 823-845
- Prus T. 1971. The assimilation efficiency of *Asellus aquaticus* L.(Crustacea, Isopoda). *Freshwater Biology*, 1, 3: 287-305
- Purves D., Augustine G.J., Fitzpatrick D., Hall W.C., LaMantia A.S., McNamara J.O., Williams S.M. 2004. *Neuroscience*. Massachusetts, Publishers Sunderland: 773 str.
- Quintaneiro C., Monteiro M., Pastorinho R., Soares A.M.V.M., Nogueira A.J.A., Morgado F., Guilhermino L. 2006. Environmental pollution and natural populations: a biomarkers case study from the Iberian Atlantic coast. *Marine pollution bulletin*, 52, 11: 1406-1413
- R Core Team. 2015. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. (21. 6. 2016)
- Rask M., Hiisivuori C. 1985. The predation on *Asellus aquaticus* (L.) by perch, *Perca fluviatilis* (L.), in a small forest lake. *Hydrobiologia*, 121: 27-33
- Ribeiro S., Guilhermino L., Sousa J.P., Soares A.M.V.M. 1999. Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 3: 287-293
- Ridley M., Thompson D.J. 1979. Size and mating in *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 51, 4: 380-397
- Robillard S., Beauchamp G., Laulier M. 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135, 1: 49-59
- Rosa R., Nunes M.L. 2002. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris*, and *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the portuguese south coast. *Crustaceana*, 75, 9: 1095-1105
- RStudio Team. 2015. *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA <http://www.rstudio.com/>. (21.6. 2016)

- Sánchez-Paz A., García-Carreño F., Muhlia-Almazán A., Peregrino-Uriarte A.B., Hernández-López J., Yepiz-Plascencia G. 2006. Usage of energy reserves in crustaceans during starvation: status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 4: 241-249
- Schill R.O., Köhler H.R. 2004. Does the environment or the source of the population define stress status and energy supply in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum*?. *Ecotoxicology*, 13, 7: 683-695
- Simčič T., Lukančič S., Brancelj A. 2005. Comparative study of electron transport system activity and oxygen consumption of amphipods from caves and surface habitats. *Freshwater Biology*, 50, 3: 494-501
- Simčič T., Brancelj A. 2006. Effects of pH on electron transport system (ETS) activity and oxygen consumption in *Gammarus fossarum*, *Asellus aquaticus* and *Niphargus sphagnicolus*. *Freshwater biology*, 51, 4: 686-694
- Simčič T., Brancelj A. 2007. The effect of light on oxygen consumption in two amphipod crustaceans-the hypogean *Niphargus stygius* and the epigeal *Gammarus fossarum*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 40, 2: 141-150
- Simon Urbanek. 2016. rJava: Low-Level R to Java Interface. R package version 0.9-8. <https://CRAN.R-project.org/package=rJava> (21.6. 2016)
- Sket B. 1994. Distribution of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae) and its hypogean populations at different geographic scales, with a note on *Proasellus istrianus*. *Hydrobiologia*, 287, 1: 39-47
- Smolders R., Bervoets L., Blust R. 2004. In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environmental Pollution*, 132, 2: 231-243
- Sparkes T.C., Keogh D.P., Pary R.A. 1996. Energetic costs of mate guarding behavior in male stream-dwelling isopods. *Oecologia*, 106, 2: 166-171
- Sroda S., Cossu-Leguille C. 2011. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere*, 83, 4: 538-544
- Stahl B.A., Gross J.B., Speiser D.I., Oakley T.H., Patel N.H., Gould D.B., Protas M.E. 2015. A Transcriptomic Analysis of Cave, Surface, and Hybrid Isopod Crustaceans of the Species *Asellus aquaticus*. *PloS one*, 10, 10: e0140484, doi:10.1371/journal.pone.0140484: 14 str.

- Stanek K., Gabrijelčič E., Drobne D., Trebše P. 2003. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* as a biomarker of organophosphorus compounds in food. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 54, 3: 183-188
- Stanek K., Drobne D., Trebše P. 2006. Linkage of biomarkers along levels of biological complexity in juvenile and adult diazinon fed terrestrial isopod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*, 64, 10: 1745-1752
- Steel E.A. 1961. Some observations on the life history of *Asellus aquaticus* (L.) and *Asellus meridianus* Racovitza (Crustacea: Isopoda). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 137, 1: 71-87
- Stenersen J., Kobro S., Bjerke M., Arend U. 1987. Glutathione transferases in aquatic and terrestrial animals from nine phyla. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 86, 1: 73-82
- Štrus J., Blejec, A. 1983. Reproductive activity in *Asellus aquaticus* (Crustacea, Isopoda) from Ljubljansko Barje. *Biološki Vestnik*, 31: 83-92
- Timofeyev M.A. 2006. Antioxidant enzyme activity in endemic Baikalean versus Palaearctic amphipods: Tagma- and size-related changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 143, 3: 302-308
- Tolba M.R., Holdich D.M. 1981. The effect of water quality on the size and fecundity of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Aquatic Toxicology*, 1, 2: 101-112
- Turk S., Sket B., Sarbu Ş. 1996. Comparison between some epigeal and hypogean populations of *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda: Asellidae). *Hydrobiologia*, 337, 1-3: 161-170
- Van Gestel C.A.M., Van Brummelen, T.C. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5, 4: 217-225
- Verovnik R., Prevorčnik S., Jugovic J. 2009. Description of a neotype for *Asellus aquaticus* Linné, 1758 (Crustacea: Isopoda: Asellidae), with description of a new subterranean *Asellus* species from Europe. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 248, 2: 101-118
- Verslycke T., Janssen C.R. 2002. Effects of a changing abiotic environment on the energy metabolism in the estuarine mysid shrimp *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279, 1: 61-72
- Vidal M.L., Bassères A., Narbonne J.F. 2002. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula*

*fluminea* (Müller). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 132, 1: 93-104

Wallace K.B., Eells J.T., Madeira V.M.C., Cortopassi G., Jones D.P. 1997. Mitochondria-mediated cell injury. Toxicological Sciences, 38, 1: 23-37

Wickham H. 2009. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York, Springer-Verlag: 260 str.

Wickham H. 2011. The split-apply-combine strategy for data analysis. Journal of Statistical Software, 40, 1: 1-29

Wilhelm F.M., Taylor S.J., Adams G.L. 2006. Comparison of routine metabolic rates of the stygobite, *Gammarus acherondytes* (Amphipoda: Gammaridae) and the stygophile, *Gammarus troglophilus*. Freshwater Biology, 51, 6: 1162-1174

Xuereb B., Chaumot A., Mons R., Garric J., Geffard O. 2009a. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. Aquatic toxicology, 93, 4: 225-233

Xuereb B., Lefèvre E., Garric J., Geffard O. 2009b. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquatic Toxicology, 94, 2: 114-122

## ZAHVALA

Magistrsko delo zame ne pomeni samo konec neke stopnje izobraževanja, ki sem jo opravil, da sem dobil naziv za imenom. Za njim se skriva več, kot na prvi pogled vidimo na velikem številu popisanih strani. Za temi stranmi je kup želja, odločitev, izkušenj in vloženega truda. Pa tudi veliko preveč popite kave, neprespanih noči, dvom in strah v prihodnost. S tem delom sem delal na samemu sebi, zaradi česar bi se zahvalil vsem, ki so bili vanj vpleteni.

Zahvaljujem se mentorju, doc. dr. Primožu Zidarju in somentorici, doc. dr. Aniti Jemec, ki sta mi s konstruktivnimi nasveti pomagala do končnega izdelka. Hvala za pomoč v laboratoriju, hitre preglede besedil in potrpežljivost ob ločevanju zrnja od plev.

Zahvalil bi se recenzentki, prof. dr. Kristini Sepčič, ki mi je s koristnimi predlogi pomagala izboljšati magistrsko delo. Hvala tudi predsednici komisije, doc. dr. Simoni Prevorčnik, za pomoč pri nastanku magistrskega dela, napotke in temeljit pregled naloge.

Zahvaljujem se tudi ostalim na Katedri za zoologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki so mi pomagali pri izdelavi magistrskega dela, še posebej Moniki Kos, Žigi Fišerju, Jožici Murko Bulić, Gregorju Bračku, Venotu Kononenku, Alenki Malovrh.

Nepogrešljivo pomoč so predstavljali moji prijatelji; predvsem Špela Borko, Teo Delić, Nataša Sivec in Behare Rexhepi. Hvala za pomoč pri terenskem delu in psihično pomoč, ko je bila ta potrebna.

Hvala moji Ester, ki mi je bila med pisanjem v vzor, spodbudo in pomoč.

Hvala moji družini, ki je v meni zanetila zanimanje za naravo in za njihovo požrtvovalnost, potrpežljivost in razumevanje ob mojem študiju.



## PRILOGE

### PRILOGA A

#### Osnovne statistike izmerjenih parametrov

**Preglednica A1:** Osnovne statistike za svežo maso vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. Prikazane so mediane vrednosti, povprečja, SN = standardna napaka, min = minimum, max = maksimum; v vsakem vzorcu je bilo po 30 osebkov.

| obdobje | lokacija  | sveža masa živali [mg] |           |      |       |       |
|---------|-----------|------------------------|-----------|------|-------|-------|
|         |           | mediana                | povprečje | SN   | min   | max   |
| pomlad  | Pl. jama  | 31.55                  | 31.01     | 1.72 | 15.70 | 55.30 |
|         | Postojna  | 26.75                  | 26.22     | 2.27 | 3.60  | 51.50 |
|         | Jakovica  | 47.20                  | 47.19     | 1.35 | 34.10 | 63.00 |
|         | Ljubljana | 19.70                  | 20.01     | 1.06 | 11.20 | 33.60 |
| poletje | Pl. jama  | 17.40                  | 19.37     | 1.43 | 8.90  | 39.90 |
|         | Postojna  | 4.35                   | 5.44      | 0.51 | 1.10  | 11.40 |
|         | Jakovica  | 3.05                   | 3.56      | 0.37 | 1.10  | 8.30  |
| jesen   | Pl. jama  | 20.45                  | 20.27     | 1.96 | 1.25  | 45.30 |
|         | Postojna  | 3.93                   | 4.03      | 0.36 | 0.83  | 9.00  |
|         | Jakovica  | 6.87                   | 7.75      | 0.78 | 2.64  | 20.70 |
|         | Ljubljana | 2.35                   | 2.59      | 0.23 | 0.85  | 5.43  |

**Preglednica A2:** Osnovne statistike za aktivnost AChE vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. Prikazane so mediane vrednosti, povprečja, SN = standardna napaka, min = minimum, max = maksimum; v vsakem vzorcu je bilo po 15 osebkov.

| obdobje | lokacija  | specifična aktivnost AChE [nmol / mg <sub>pr</sub> min] |           |      |       |       |
|---------|-----------|---|-----------|------|-------|-------|
|         |           | mediana   | povprečje | SN   | Min   | max   |
| pomlad  | Pl. jama  | 3.73  | 4.09      | 0.41 | 1.90  | 7.93  |
|         | Postojna  | 10.76   | 11.35     | 1.14 | 5.57  | 20.15 |
|         | Jakovica  | 11.14   | 11.08     | 0.74 | 6.45  | 18.29 |
|         | Ljubljana | 11.48   | 12.72     | 0.82 | 9.37  | 20.91 |
| poletje | Pl. jama  | 2.65  | 2.95      | 0.31 | 1.25  | 4.96  |
|         | Postojna  | 9.93  | 11.48     | 1.54 | 0.77  | 25.31 |
|         | Jakovica  | 16.61   | 19.11     | 2.16 | 10.07 | 44.37 |
| jesen   | Pl. jama  | 4.64  | 4.18      | 0.54 | 0.90  | 7.63  |
|         | Postojna  | 10.13   | 10.47     | 0.82 | 5.90  | 17.24 |
|         | Jakovica  | 14.10   | 14.12     | 1.25 | 4.02  | 23.26 |
|         | Ljubljana | 14.74   | 15.21     | 1.45 | 0.03  | 22.47 |

**Preglednica A3:** Osnovne statistike za aktivnost GST vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. Prikazane so mediane vrednosti, povprečja, SN = standardna napaka, min = minimum, max = maksimum; v vsakem vzorcu je bilo po 15 osebkov.

| obdobje | lokacija  | specifična aktivnost GST [nmol / mg <sub>pr</sub> min] |           |      |       |        |
|---------|-----------|--|-----------|------|-------|--------|
|         |           | mediana  | povprečje | SN   | min   | Max    |
| pomlad  | Pl. jama  | 33.84  | 33.30     | 2.38 | 20.30 | 54.00  |
|         | Postojna  | 55.07  | 57.16     | 5.25 | 32.08 | 104.42 |
|         | Jakovica  | 30.17  | 30.04     | 0.95 | 22.66 | 37.46  |
|         | Ljubljana | 53.42  | 57.93     | 3.35 | 46.65 | 95.45  |
| poletje | Pl. jama  | 33.19  | 32.16     | 2.20 | 16.80 | 44.19  |
|         | Postojna  | 69.23  | 75.10     | 7.06 | 40.30 | 126.06 |
|         | Jakovica  | 73.02  | 86.19     | 7.02 | 56.64 | 133.17 |
| jesen   | Pl. jama  | 21.55  | 23.68     | 2.13 | 13.95 | 46.09  |
|         | Postojna  | 44.45  | 45.31     | 2.17 | 34.75 | 62.75  |
|         | Jakovica  | 49.13  | 48.69     | 3.88 | 25.68 | 70.92  |
|         | Ljubljana | 60.18  | 63.40     | 3.28 | 46.24 | 88.98  |

**Preglednica A4:** Osnovne statistike za količino lipidov vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. Prikazane so mediane vrednosti, povprečja, SN = standardna napaka, min = minimum, max = maksimum; v vsakem vzorcu je bilo po 15 osebkov.

| obdobje | lokacija  | količina lipidov [μg/mg <sub>sm</sub> ] |           |       |       |        |
|---------|-----------|---|-----------|-------|-------|--------|
|         |           | mediana                                 | povprečje | SN    | min   | max    |
| pomlad  | Pl. jama  | 10.43                                   | 10.18     | 1.38  | 4.68  | 26.44  |
|         | Postojna  | 11.87                                   | 16.91     | 2.79  | 6.09  | 44.39  |
|         | Jakovica  | 6.46                                    | 6.63      | 0.49  | 4.16  | 12.07  |
|         | Ljubljana | 7.34                                    | 7.53      | 0.45  | 5.03  | 11.17  |
| poletje | Pl. jama  | 5.60                                    | 8.43      | 1.81  | 2.59  | 24.59  |
|         | Postojna  | 10.64                                   | 17.42     | 5.16  | 2.55  | 82.86  |
|         | Jakovica  | 21.69                                   | 20.73     | 2.86  | 5.61  | 49.18  |
| jesen   | Pl. jama  | 5.21                                    | 7.99      | 1.76  | 2.60  | 29.35  |
|         | Postojna  | 16.87                                   | 32.35     | 10.53 | 2.69  | 137.36 |
|         | Jakovica  | 7.89                                    | 9.63      | 1.39  | 2.59  | 22.87  |
|         | Ljubljana | 24.74                                   | 25.76     | 2.40  | 12.91 | 40.71  |

**Preglednica A5:** Osnovne statistike za količino ogljikovih hidratov vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. Prikazane so mediane vrednosti, povprečja, SN = standardna napaka, min = minimum, max = maksimum; v vsakem vzorcu je bilo po 15 osebkov.

| obdobje | lokacija  | količina ogljikovih hidratov [ $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ] |           |      |       |       |
|---------|-----------|--|-----------|------|-------|-------|
|         |           | mediana  | povprečje | SN   | min   | max   |
| pomlad  | Pl. jama  | 14.31  | 15.74     | 2.07 | 4.96  | 32.52 |
|         | Postojna  | 18.16  | 17.94     | 1.99 | 4.91  | 34.34 |
|         | Jakovica  | 18.34  | 17.72     | 1.32 | 10.00 | 27.95 |
|         | Ljubljana | 14.09  | 13.93     | 0.78 | 9.79  | 19.61 |
| poletje | Pl. jama  | 10.75  | 11.81     | 0.98 | 6.25  | 19.37 |
|         | Postojna  | 16.44  | 16.66     | 1.24 | 7.97  | 23.67 |
|         | Jakovica  | 11.23  | 15.58     | 2.35 | 3.89  | 38.44 |
| jesen   | Pl. jama  | 7.66   | 8.42      | 0.99 | 4.07  | 19.96 |
|         | Postojna  | 12.62  | 12.90     | 1.64 | 4.02  | 23.70 |
|         | Jakovica  | 7.16   | 8.81      | 1.51 | 2.30  | 25.22 |
|         | Ljubljana | 20.29  | 19.53     | 2.55 | 2.71  | 41.15 |

**Preglednica A6:** Osnovne statistike za količino proteinov vodnih osličkov na vzorčenih lokacijah, za tri letne čase. Prikazane so mediane vrednosti, povprečja, SN = standardna napaka, min = minimum, max = maksimum; v vsakem vzorcu je bilo po 15 osebkov.

| obdobje | lokacija  | vsebnost proteinov [ $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{sm}}$ ] |           |       |       |        |
|---------|-----------|--|-----------|-------|-------|--------|
|         |           | mediana  | povprečje | SN    | min   | max    |
| pomlad  | Pl. jama  | 97.24  | 93.70     | 3.26  | 66.23 | 112.09 |
|         | Postojna  | 68.74  | 71.30     | 5.64  | 43.55 | 137.69 |
|         | Jakovica  | 66.99  | 67.20     | 1.42  | 59.55 | 77.24  |
|         | Ljubljana | 75.36  | 75.15     | 3.21  | 54.98 | 100.14 |
| poletje | Pl. jama  | 94.23  | 103.60    | 8.31  | 61.08 | 190.06 |
|         | Postojna  | 104.18   | 117.86    | 11.68 | 46.54 | 178.94 |
|         | Jakovica  | 111.95   | 117.21    | 9.34  | 75.87 | 232.51 |
| jesen   | Pl. jama  | 112.27   | 117.43    | 10.94 | 64.97 | 232.59 |
|         | Postojna  | 139.41   | 142.49    | 8.52  | 92.47 | 216.26 |
|         | Jakovica  | 98.41  | 102.54    | 5.32  | 73.42 | 161.64 |
|         | Ljubljana | 123.98   | 120.35    | 5.13  | 89.02 | 153.88 |