

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mirjana BISTAN

**VPLIV STRUPENIH DEJAVNIKOV NA PROFIL
CELIČNIH MAŠČOBNIH KISLIN BAKTERIJE**
Pseudomonas putida

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mirjana BISTAN

**VPLIV STRUPENIH DEJAVNIKOV NA PROFIL CELIČNIH
MAŠČOBNIH KISLIN BAKTERIJE *Pseudomonas putida***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF TOXIC COMPOUNDS ON CELLULAR FATTY ACID
PROFILE OF BACTERIA *Pseudomonas putida***

GRADUATION THESIS
Univesity Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije.

Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete v Domžalah.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega študija mikrobiologije z dne 5. 7. 2006 in 29. 8. 2007 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar in za recenzenta prof. dr. David Stopar.

Mentorica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Recenzent: prof. dr. David STOPAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mirjana Bistan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 615.9+504.054:576.32/36:579.6(043)=863
KG ekotoksikologija/biološki testi/*Pseudomonas putida*/fluidnost celične membrane/maščobne kisline/profil dolgoveržnih maščobnih kislin/FAME/trans-cis razmerje maščobnih kislin/GC/strupene spojine/formaldehid/fenol/živo srebro/atrazin/metolaklor/ heksaklorbenzen/pentaklorbifenil/fluoranten
AV BISTAN, Mirjana
SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica) / STOPAR, David (recenzent)
KZ SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2007
IN VPLIV STRUPENIH DEJAVNIKOV NA PROFIL CELIČNIH MAŠČOBNIH KISLIN BAKTERIJE *Pseudomonas putida*
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XII, 69 str., 5 pregl., 43 sl., 18 pril., 56 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Za ugotavljanje prisotnosti onesnaževal v okolju uporabljamo poleg različnih, dobro poznanih kemijskih metod tudi biološke teste, s katerimi določimo negativne vplive onesnaževal na žive organizme. V diplomskem delu smo s pripravo metilnih estrov maščobnih kislin (FAME) in transesterifikacijo s kislim katalizatorjem ter detekcijo FAME s plinsko kromatografijo na nepolarni koloni ugotavljali spremembe v profilih maščobnih kislin (MK) bakterije *P. putida* ob prisotnosti različnih koncentracij izbranih strupenih spojin: formaldehid (FA), fenol (PH), živo srebro (Hg), atrazin (ATR), metolaklor (MET), heksaklorbenzen (HCB), pentaklorbifenil (PCB) in fluoranten (FL) ter mešanic: ATR+MET, ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃. Hkrati smo spremljali tudi rast bakterije *P. putida*. V primeru dodanega PH se je rast kulture *P. putida* povečala, ob dodatku PCB v koncentraciji 1000 µg/L in mešanic ATR+MET+NH₄NO₃ pa zmanjšala. Pojavljanje razvejanih MK ob dodatku PH ter zmanjšanje razmerja trans/cis MK ob dodatku mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃ poveča fluidnost celične membrane. NH₄NO₃ poveča fluidnost celične membrane in tako omogoči pesticidom lažji vstop v celico. HCB, PCB in FL povzročijo zmanjšanje fluidnosti celične membrane, kar se kaže kot povečanje razmerja trans/cis MK. Pri dodatku FL v koncentraciji 2000 µg/L se zmanjšanje fluidnosti opazi tudi kot zmanjšanje razmerja nenasičene/nasičene MK. FA, Hg, ATR, MET in mešanice ATR+MET ne povzročijo sprememb v profilu MK *P. putida*. Spremembe v profilu celičnih MK pri bakteriji *P. putida* so se izkazale kot ustrezen biomarker le za HCB, PCB in FL, ne pa tudi za ostala izbrana okoljska onesnaževala.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
DC UDC 615.9+504.054:576.32/36:579.6(043)=863
CX ecotoxicology/biological methods/*Pseudomonas putida*/cell membrane fluidity/long-chain fatty acids /FAME/trans-cis ratio of fatty acids/GC/toxic compounds/formaldehyde/phenols/mercury/atrazine/metolachlor/hexachlorobenzene/pentachlorobiphenyl/fluoranthene
CC BISTAN, Mirjana
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor) / STOPAR, David (reviewer)
PP SI- 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2007
TI INFLUENCE OF TOXIC COMPOUNDS ON CELLULAR FATTY ACID PROFILE OF BACTERIA *Pseudomonas putida*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 69 p., 5 tab., 43 fig., 18 ann., 56 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Organic and heavy metal pollution has become a big rising world problem. For monitoring of different pollutants in environment we use beside chemical analysis also different biological methods, so called biotests. We can determine potential negative effects of pollutants on living organisms by them. In this work we have analysed changes in cellular fatty acid profiles of bacteria *P. putida* in presence of different toxic compounds: formaldehyde (FA), phenol (PH), mercury (Hg), atrazine (ATR), metolachlor (MET), hexachlorobenzene (HCB), pentachlorobiphenyl (PCB), fluoranthene (FL) and mixtures ATR+MET, ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃. Long-chain fatty acids were transesterified with HCl in methanol and their methyl esters were analysed by gas chromatography using a non-polar column. We were following the growth of *P. putida* at the same time. We see that growth of *P. putida* was increased at the presence of PH whereas growth of *P. putida* was decreased at the presence of PCB in concentration 1000 µg/L and the mixtures of ATR+MET+NH₄NO₃. Appearance of branched fatty acids in case of PH and the reduction of trans/cis ratio of unsaturated fatty acids in case of mixtures ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ and ATR+MET+NH₄NO₃ caused the increase in fluidity of cell membrane. NH₄NO₃ caused the increase in fluidity of cell membrane and by that it enabled easier entrance of pesticides in the cell. HCB, PCB and FL caused decrease in fluidity of cell membrane which is shown as the increase of trans/cis ratios. At addition FL in concentration 2000 µg/L decreased fluidity is shown also as decreased unsaturated/saturated ratio of fatty acids. FA, Hg, ATR, MET and mixtures ATR+MET did not cause any changes in fatty acid profiles in *P. putida*. Changes in fatty acid profile of bacteria *P. putida* are shown to be good biomarker only for HCB, PCB and FL, but not for other tested toxic compounds.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EKOTOKSIKOLOGIJA IN ONESNAŽEVANJE OKOLJA	3
2.2 MONITORING OKOLJA (VODA) IN BIOTESTI	5
2.3 CELIČNA MEMBRANA	6
2.3.1 Struktura in nomenklatura dolgoverižnih MK pri bakterijah	6
2.3.2 Celični profili MK	8
2.3.2.1 Metode, uporabljene za ugotavljanje profila MK	9
2.3.2.2 Celični profil MK bakterije <i>Pseudomonas putida</i>	9
2.3.3 Membranski lipidi in homeofazna adaptacija	10
2.4 STRUPENE SNOVI V OKOLJU IN NJIHOV VPLIV NA SESTAVO MEMBRAN MIKROORGANIZMOV	11
2.4.1 Vpliv okoljskega stresa na fluidnost celične membrane	11
2.4.1.1 Cis-trans izomerizacija kot odgovor na okoljski stres	11
2.4.1.2 Pojavljanje MK s ciklopropanskim obročem kot odgovor na okoljski stres	14
2.4.1.3 Vpliv okoljskega stresa na proteine	14
2.4.2 Strupene spojine in njihove lastnosti	15

3	MATERIALI IN METODE	17
3.1	BAKTERIJA	17
3.2	KEMIKALIJE	17
3.2.1	Izbor strupenih spojin, s katerimi smo preizkušali strupenost na <i>P. putida</i>	18
3.3	POTEK POSKUSOV	19
3.3.1	Gojenje bakterijske kulture <i>P. putida</i>	20
3.3.2	Merjenje optične gostote (OD₆₅₄)	22
3.3.3	Priprava za liofilizacijo in liofilizacija celic <i>P. putida</i>	23
3.3.4	Priprava metilnih estrov MK in transesterifikacija s kislim katalizatorjem	23
3.3.4.1	Priprava metilnih estrov MK	23
3.3.4.2	Transesterifikacija s kislim katalizatorjem	23
3.3.5	Analiza FAME na nepolarni koloni	24
3.3.6	Identifikacija FAME s faktorji ekvivalentne dolžine verige (ECL)	25
3.3.7	Ovrednotenje rezultatov FAME	26
3.3.8	Statistična analiza rezultatov	27
4	REZULTATI	28
4.1	RAST <i>P. putida</i> V PRISOTNOSTI IZBRANIH STRUPENIH SPOJIN	28
4.2	PROFILI CELIČNIH MK PRI <i>P. putida</i> OB DODATKU IZBRANIH STRUPENIH SPOJIN IN NJIHOVIH MEŠANIC	32
4.3	DELEŽI MK TER RAZMERJA TRANS/CIS MK IN NENASIČENE/NASIČENE MK	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	55
6	POVZETEK	61
7	VIRI	63
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Izbrane strupene spojine, ki smo jih uporabili v raziskavi ter njihove dovoljene koncentracije v okolju.....	16
Preglednica 2: Uporabljene koncentracije izbranih strupenih spojin.....	21
Preglednica 3: Uporabljene mešanice strupenih spojin in njihove koncentracije.....	21
Preglednica 4: Uporabljene mešanice strupenih spojin z NH_4NO_3 ter njihove koncentracije	22
Preglednica 5: Vsebnost MK v standardnih mešanicah BAME in MIDI in pripadajoči retencijski časi (Rt).....	25

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema poteka onesnaževanja in odziva ekosistema (Baltic University Environmental Science, 2006)	4
Slika 2: Struktura celične membrane kot fluidnega mozaika (Kaur in sod., 2005)	6
Slika 3: Kemijske strukture nasičene MK, <i>cis</i> in <i>trans</i> nenasičene MK, razvejane MK, hidroksi MK in MK s ciklopropanskim obročem (Christie, 2007)	7
Slika 4: Shema MK kot biomarkerjev v kemotaksonomiji (Osipov, 2004).....	8
Slika 5: Različna konformacija fosfolipidov in njihov vpliv na strukturo oz. fluidnost lipidnega dvosloja. A: nasičene MK; B: <i>cis</i> - nenasičene MK; C: <i>trans</i> - nenasičene MK (Ingram, 1976)	12
Slika 6: Shema izomerizacije <i>cis</i> mononenasičene MK (oleinska kislina) v <i>trans</i> obliko z encimom <i>cis-trans</i> -izomeraza (CTI) (Heipieper in sod., 2003).....	13
Slika 7: Shema nastanka MK s ciklopropanskim obročem iz <i>cis</i> nenasičene MK (Kaur in sod., 2005)	14
Slika 8: Strukturne formule fenola, formaldehida, atrazina, metolaklor, HCB, PCB in fluorantena (Australian Government..., 2007; Ritter in sod., 1995; Ternifi, 1998; U.S. Department of..., 1995; WHO, 2003b) .	16
Slika 9: Shema poteka poskusov	19
Slika 10: Shema transesterifikacije s kislim katalizatorjem (Christie, 2003)	24
Slika 11: Rast bakterijske kulture <i>P. putida</i> ob dodatku formaldehida (FA) v koncentracijah FA4= 6 µg/L in FA5= 0,6 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK)	28
Slika 12: Rast bakterijske kulture <i>P. putida</i> ob dodatku fenola (PH) v koncentracijah PH1= 16384 µg/L, PH2= 1024 µg/L in PH3= 64 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK)	29
Slika 13: Rast bakterijske kulture <i>P. putida</i> ob dodatku fenola (PH) v koncentracijah PH4= 190 µg/L , PH5=19 µg/L in PH6= 1,9 µg/L v primerjavi z negativno kontrolo <i>P. putida</i> (NK).....	29
Slika 14: Rast bakterijske kulture <i>P. putida</i> ob dodatku ATR (ATR1= 1000 µg/L), MET (MET1= 1000 µg/L), HCB (HCB1= 1000 µg/L), PCB (PCB1= 1000 µg/L) in FL (FL1= 2000 µg/L) v primerjavi z rastjo negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	30
Slika 15: Rast <i>P. putida</i> ob dodatku mešanice ATR+MET+NH ₄ NO ₃ (katerih koncentracije so navedene v Preglednici 3) v primerjavi z rastjo negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO) in kulture <i>P. putida</i> gojene v prisotnosti dodanega NH ₄ NO ₃ (v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4)	31
Slika 16: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti različnih koncentracij FA (FA1= 16384 µg/L, FA2= 1024 µg/L in FA3= 64 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK).....	32
Slika 17: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti formaldehida (FA) v koncentracijah FA4= 6 µg/L in FA5= 0,6 µg/L v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK)	33

Slika 18: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob dodanem fenolu (PH) v koncentracijah PH1= 16384 µg/L, PH2= 1024 µg/L in PH3= 64 µg/L v primerjavi s profilom MK negativne kontrole kulture <i>P. putida</i> (NK).....	34
Slika 19: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob dodanem fenolu (PH) v koncentracijah PH4= 190 µg/L, PH5=19 µg/L in PH6= 1,9 µg/L v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK).....	34
Slika 20: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti Hg v koncentraciji 200,6 µg/L v primerjavi s profilom negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK).....	35
Slika 21: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti Hg v koncentracijah Hg1= 200, 6 µg/L, Hg2= 20,06 µg/L, Hg3= 2,006 µg/L in Hg4= 0,2006 µg/L v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK).....	36
Slika 22: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti različnih koncentracij ATR (ATR2= 10 µg/L, ATR3= 1 µg/L, ATR4= 0,1 µg/L in ATR5= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	37
Slika 23: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti različnih koncentracij MET (MET2= 1 µg/L, MET3= 0,1 µg/L in MET4= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	37
Slika 24: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti različnih koncentracij HCB (HCB2= 1 µg/L, HCB3= 0,1 µg/L in HCB 4= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	38
Slika 25: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti različnih koncentracij PCB (PCB2= 10 µg/L, PCB3= 1 µg/L, PCB4= 0,1 µg/L in PCB5= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	39
Slika 26: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti različnih koncentracij FL (FL2= 2 µg/L, FL3= 0,2 µg/L in FL4= 0,02 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	40
Slika 27: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob prisotnosti ATR, MET, HCB, PCB in FL v koncentracijah ATR1= 1000 µg/L, MET1= 1000 µg/L, HCB1= 1000 µg/L, PCB1= 1000 µg/L in FL1= 2000 µg/L v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	41
Slika 28: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanice ATR+MET v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 3 v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	42
Slika 29: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanice ATR+NH ₄ NO ₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4 (* pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 100 mg/L, ** pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 50 mg/L in *** pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 20 mg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	43
Slika 30: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanice MET+NH ₄ NO ₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4 (* pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 100 mg/L, ** pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 50 mg/L in *** pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 20 mg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	44
Slika 31: Profili MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanice ATR+MET+NH ₄ NO ₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4 (* pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 100 mg/L, ** pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 50 mg/L in *** pomeni koncentracijo NH ₄ NO ₃ = 20 mg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO).....	45

Slika 32: Deleži MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku FA1, FA2, FA3, PH1, PH2, PH3 in Hg1 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK)	46
Slika 33: Razmerje trans/cis MK in razmerje nenasičene/nasičene MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku FA1, FA2, FA3, PH1, PH2, PH3, Hg1 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z negativno kontrolo <i>P. putida</i> (NK)	47
Slika 34: Deleži MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku FA4, FA5, PH4, PH5, PH6, Hg1, Hg2, Hg3, Hg4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK)	48
Slika 35: Razmerje trans/cis MK in razmerje nenasičene/nasičene MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku FA4, FA5, PH4, PH5, PH6, Hg1, Hg2, Hg3 in Hg4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z negativno kontrolo <i>P. putida</i> (NK)	48
Slika 36: Deleži MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku ATR2,3,4,5; MET2,3,4; HCB2,3,4; PCB2,3,4,5; FL2,3,4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	49
Slika 37: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku ATR2,3,4,5; MET2,3,4; HCB2,3,4; PCB2,3,4,5 in FL2,3,4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z negativno kontrolo <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	50
Slika 38: Deleži MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku ATR1= 1000 µg/L, MET1= 1000 µg/L, HCB1= 1000 µg/L, PCB1= 1000 µg/L in FL1= 2000 µg/L v primerjavi z deleži MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	51
Slika 39: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku ATR1= 1000 µg/L, MET1= 1000 µg/L, HCB1= 1000 µg/L, PCB1= 1000 µg/L in FL1= 2000 µg/L v primerjavi z negativno kontrolo <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	51
Slika 40: Deleži MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanic ATR+MET (koncentracije posameznih spojin v mešanici ATR+MET so prikazane v Preglednici 3) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	52
Slika 41: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanic ATR+MET (koncentracije posameznih spojin v mešanici ATR+MET so prikazane v Preglednici 3) v primerjavi z negativno kontrolo <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	53
Slika 42: Deleži MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanic ATR+NH ₄ NO ₃ , MET+NH ₄ NO ₃ , ATR+MET+NH ₄ NO ₃ (koncentracije mešanic so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	53
Slika 43: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri <i>P. putida</i> ob dodatku mešanic ATR+NH ₄ NO ₃ , MET+NH ₄ NO ₃ , ATR+MET+NH ₄ NO ₃ (koncentracije mešanic so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z negativno kontrolo <i>P. putida</i> (NK z DMSO)	54

KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Kromatogram standardne mešanice BAME
- Priloga A2: Kromatogram vzorca HCB3
- Priloga B: Seznam v raziskavi omenjenih MKA s sistematskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL
- Priloga C1: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku (FA) v koncentracijah FA1= 16384 µg/L, FA2= 1024 µg/L in FA3= 64 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK)
- Priloga C2: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku Hg v koncentraciji 200,6 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrolne kulture *P. putida* (NK)
- Priloga C3: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku Hg v koncentracijah Hg1= 200, 6 µg/L, Hg2= 20,06 µg/L, Hg3= 2,006 µg/L in Hg4= 0,2006 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK)
- Priloga C4: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku atrazina (ATR) v koncentracijah ATR2= 10 µg/L, ATR3= 1 µg/L, ATR4= 0,1 µg/L in ATR5= 0,01 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C5: bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku metolaklor (MET) v koncentracijah MET2= 1 µg/L, MET3= 0,1 µg/L in MET4= 0,01 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C6: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku heksaklorbenzena (HCB) v koncentracijah HCB2= 1 µg/L, HCB3= 0,1 µg/L in HCB 4= 0,01 µg/ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C7: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku pentaklorbifenila (PCB) v koncentracijah PCB2= 10 µg/L, PCB3= 1 µg/L, PCB4= 0,1 µg/L in PCB5= 0,01 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C8: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku fluorantena (FL) v koncentracijah FL2= 2 µg/L, FL3= 0,2 µg/L in FL4= 0,02 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C9: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku mešanice ATR+MET v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 2 v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C10: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku NH₄NO₃ in mešanic ATR+NH₄NO₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 3 v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C11: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku NH₄NO₃ in mešanic MET+NH₄NO₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4 v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C12: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku NH₄NO₃ (koncentracije so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga C13: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku NH₄NO₃, (koncentracije so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK)
- Priloga D1: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku NH₄NO₃ (koncentracije so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO)
- Priloga D2: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku NH₄NO₃, (koncentracije so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
ATR	atrazin
BAME	standardna kalibracijska mešanica bakterijskih FAME v metil-kaproatu (Bacterial Acid Methyl Ester)
c	<i>cis</i> oblika dvojne vezi
CFA-sintaza	encim, ki omogoča nastanek MK s ciklopropanskim obročem (cyclo fatty acid synthase)
CTI	cis-trans-izomeraza
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSM	Nemška zbirka mikrobnih in celičnih kultur (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
ECL	(faktor) ekvivalentne dolžine verige (Equivalent Chain Length)
FA	formaldehid
FAME	metilni estri maščobnih kislin (Fatty Acid Methyl Esters)
FID	plamensko-ionizacijski detektor (Flame-Ionization Detector)
FL	fluoranten
GC	plinska kromatografija (Gas Chromatography)
HACH epruveta	epruveta z navoji proizvajalca HACH (HACH Company, Loveland, Colorado, USA)
HCB	heksaklorbenzen
MET	metolaklor
MIDI	standardna kalibracijska mešanica FAME v heksanu
MK	maščobna kislina
NK	negativna kontrola
OD	optična gostota (Optical Density)
PAH	policiklični aromatski ogljikovodiki
PCB	pentaklorbifenil
PH	fenol
<i>P.putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Rt	retencijski čas
t	<i>trans</i> oblika dvojne vezi

1 UVOD

Onesnaževanje je danes pereč problem, ki zajema celoten planet. Odlaganje strupenih snovi v okolje je postalo vsakdanje opravilo večine prebivalstva. Ob tem na drugi strani vedno več sredstev in časa vlagamo v reševanje problema onesnaženega okolja. Onesnaževala, ki pridejo v okolje po različnih poteh, iz raznih industrijskih obratov, iz kmetijstva, iz mestnega okolja... se tam kopičijo, saj so pogosto težko razgradljiva ali celo nerazgradljiva.

Negativne vplive onesnaževal na okolje in živa bitja ter usodo onesnaževal v okolju preučuje ekotoksikologija. Z monitoringom okolja sledimo onesnaževala v okolju in ugotavljamo njihove vplive na okolje. V sklop monitoringa, poleg različnih kemijskih metod, spadajo tudi različni biotesti, s katerimi ugotavljamo biološki vpliv nekega onesnaževala na okolje. Velika prednost biotestov je, da nam povedo kako organizem odreagira na prisotnost strupene spojine. S kemijskimi analitskimi metodami namreč zaznamo prisotnost neke strupene spojine v okolju, vendar pri tem nič ne izvemo o biološkem vplivu strupene spojine na organizme, o medsebojnem delovanju različnih onesnaževal (sinergizem, antagonizem, aditivizem) in o bioaktivaciji.

Ker so biološki vplivi za številna okoljska onesnaževala še nepoznani, razvijamo nove bioteste, da bi jih z njimi čimbolj občutljivo sledili. Glede na prevladujoči trend v toksikologiji, ki se izogiba uporabi bolj razvitih živih bitij (3R koncept) (Hartung in sod., 2003) so dobrodošli biotesti, v katerih uporabljamo mikroorganizme.

Z razvojem novih biotestov bomo lahko še bolj zanesljivo in z večjo občutljivostjo ugotavljali negativne vplive onesnaževal na živa bitja (tudi na človeka) ter se na podlagi rezultatov odločali o nadaljnjem ukrepanju.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V diplomskem delu smo želeli eksperimentalno preizkusiti, če se organizem *Pseudomonas putida* odziva na prisotnost izbranih okoljskih onesnaževal s spremembo profila celičnih maščobnih kislin. Glede na to, da se mikroorganizmi sami branijo pred stresnimi dejavniki v okolju s spremembami fluidnosti (sestave) celične membrane, smo predvidevali, da bomo s predlaganimi metodami (ekstrakcija maščobnih kislin in analiza le-teh s plinsko kromatografijo) zaznali učinke izbranih okoljskih onesnaževal, ki se bodo odražali v spremembi profilov maščobnih kislin bakterije *P. putida*.

Namen našega dela je bil ugotoviti vpliv izbranih strupenih spojin, njihovih mešanic ter mešanic strupenih spojin z amonijevim nitratom na profil maščobnih kislin bakterije *P. putida*. Pri tem smo bakterijsko kulturo gojili v prisotnosti izbranih strupenih spojin in vzporedno spremljali tudi njeno rast z merjenjem optične gostote.

Končni cilj našega dela je bil preizkus osnovnih pogojev za razvoj alternativnega biotesta z bakterijo *P. putida*, pri kateri sledimo spremembe profilov celičnih MK kot odgovor na okoljska onesnaževala.

2 PREGLED OBJAV

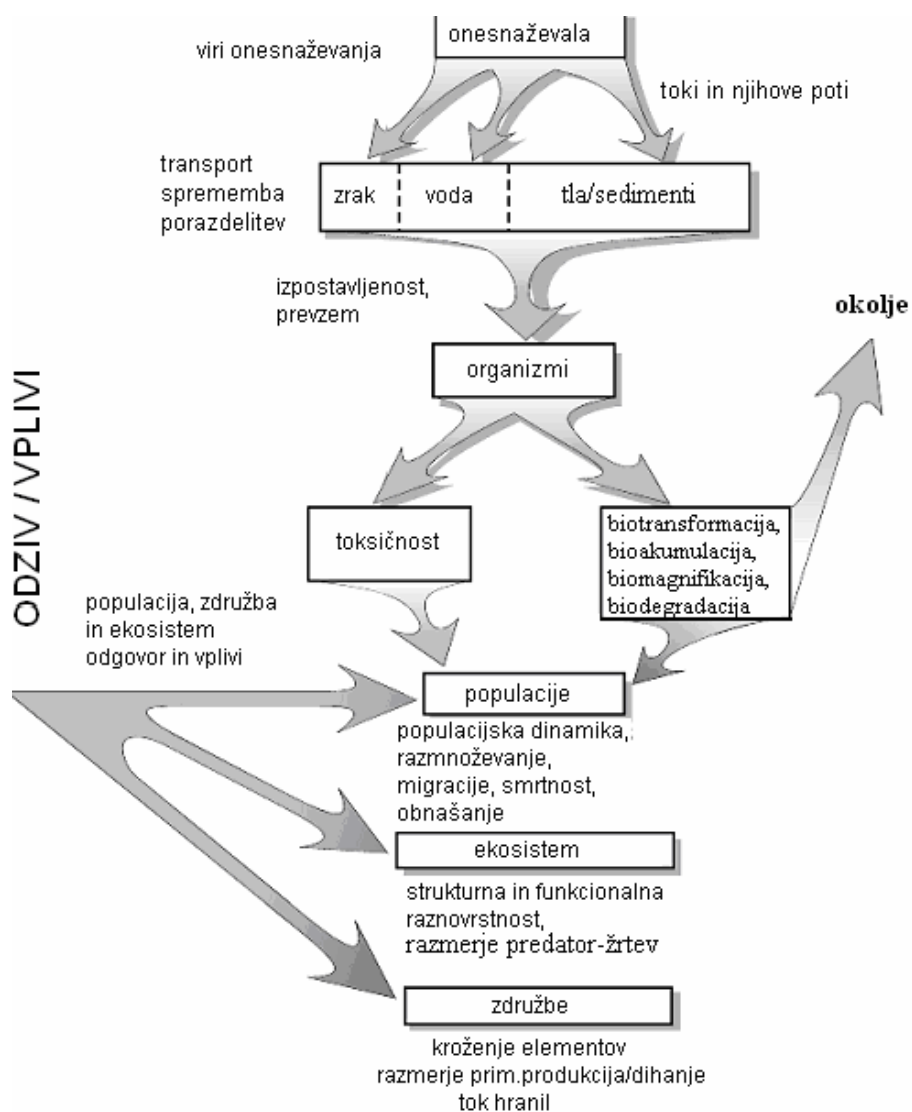
2.1 EKOTOKSIKOLOGIJA IN ONESNAŽEVANJE OKOLJA

Ekotoksikologija je veda, ki preučuje ekološke in toksikološke vplive kemijskih onesnaževal na organizme, populacije, združbe in celoten ekosistem ter zajema tudi usodo (transport, transformacije in razpad) teh onesnaževal v okolju (Forbes in Forbes, 1994).

Onesnaževanje je splošno definirano kot izpuščanje onesnaževal v okolje, kjer povzročijo različne negativne učinke na živih organizmih in ekosistemih. Lahko je točkovno (industrijski obrati) ali netočkovno (izpiranje iz kmetijskih površin, vpliv mest, onesnaževanje iz atmosfere...) in med različnimi deli ekosistemov kroži preko zraka, zemlje ali vode.

Vpliv nekega onesnaževala na okolje, kot tudi na posameznika v njem, je težko določiti, saj so biološke, kemijske in fizikalne interakcije onesnaževala z ekosistemom zapletene in težko napovedljive. Prihaja tudi do sprememb onesnaževal zaradi kemijskih in fizikalnih dejavnikov, ki povečajo ali zmanjšajo vpliv le-teh na okolje.

Razširjenost onesnaževal v vodnih okoljih je odvisna od njihovih fizikalnih in kemijskih lastnosti, kot tudi od procesov, kot so: uplinjanje spojine in izhod iz vodnega okolja v atmosfero (volatilizacija), vnos spojine iz zraka (precipitacija) ter izpiranje iz zemlje (Forbes in Forbes, 1994).



Slika 1: Shema poteka onesnaževanja in odziva ekosistema (Baltic University Environmental Science, 2006)

Današnje okoljske raziskave težijo predvsem v smer hitrega monitoringa ter iskanja novih učinkovitih procesov za izboljšanje trenutnega stanja okolja.

2.2 MONITORING OKOLJA (VODA) IN BIOTESTI

Površinske in talne vode neprestano prejemajo različne vrste onesnaževal znane in neznanе kemijske narave, ki izhajajo neposredno iz industrijske in kmetijske dejavnosti ter iz gospodinjstev in posredno iz komunalnih in drugih čistilnih naprav. Različne vire vode uporabljamo kot pitno vodo, v kmetijske in rekreacijske namene in onesnaženje posledično pomeni resno zdravstveno grožnjo človeku. Na drugi strani pa vsako onesnaženje pomeni grožnjo vodnemu ekosistemu, saj onesnaževala z vstopom v kompleksno okoljsko mešanico kot je vodno okolje lahko sprožijo nepredvidljivo kaskado škodljivih učinkov z nepredvidljivimi posledicami (Marinšek Logar, 2007).

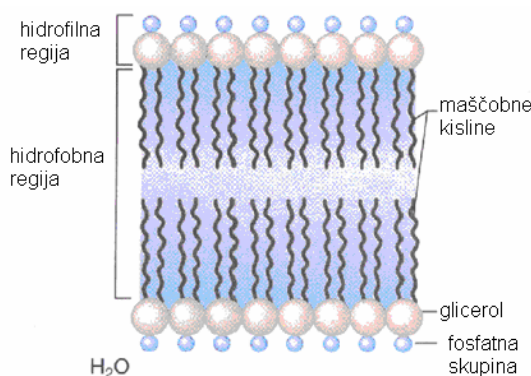
Glede na strmo naraščajoče število in količino znanih in predvsem nepoznanih onesnaževal in njihovih pretvorbenih produktov v vodah se je v zadnjih letih močno povečala potreba po razvoju novih metod okoljskega monitoringa. Sodobni trendi težijo k dvo- stopenjskemu načinu monitoringa vodnih ekosistemov. Ta je usmerjen tako, da v prvem koraku s sodobnimi, relativno cenenimi in po možnosti standardiziranimi biološkimi metodami hitro in v velikem številu vzorcev presejalno ocenimo negativne biološke učinke celokupne mešanice onesnaževal v vodah (toksičnost, genotoksičnost, estrogenost). Pri vzorcih, kjer se kaže negativen biološki vpliv, pa v drugem koraku s klasičnimi kemijskimi analitskimi metodami (kot so npr. plinska kromatografija z masno sprektrometrijo, tekočinska kromatografija z masno spektrometrijo, ...) identificiramo in kvantificiramo spojine, ki učinke povzročajo (Farre in sod., 2005).

Z biološkimi metodami lahko zajamemo tudi medsebojne vplive posameznih sestavin, ki jih s kemijskimi analizami ne moremo izmeriti in se izrazijo kot aditivizem, sinergizem ali antagonizem. Prav tako lahko ocenimo strupenost oz. nestrupenost celotnega vzorca z vsemi interakcijami v mešanici in ocenimo tveganje, ne glede na fizikalno in kemijsko sestavo (Rand, 1995).

Biološke teste lahko uvrščamo po vrstah organizmov ali po biokemičnih odgovorih. Biokemični odgovori vključujejo poleg drugih tudi odgovore na nivoju celične membrane-spremembe v lipidih.

2.3 CELIČNA MEMBRANA

Celična membrana je pregrada, ki ločuje notranjost celice od njenega okolja. Preko nje celica sprejema specifična hranila in druge molekule, ki jih rabi, ter izloča odpadne produkte. Je iz fosfolipidnega dvosloja, v katerem so fosfogliceroli, ki predstavljajo hidrofilen del dvosloja, in nanje vezane maščobne kisline (MK), ki predstavljajo hidrofoben del dvosloja. Celična membrana je fluidna, fosfolipidi in proteini imajo sposobnost prostega gibanja znotraj strukture, zato je model membrane prikazan kot fluidni mozaik. Membrana vzdržuje svojo fluidnost predvsem na nivoju MK (Madigan in sod., 2003).



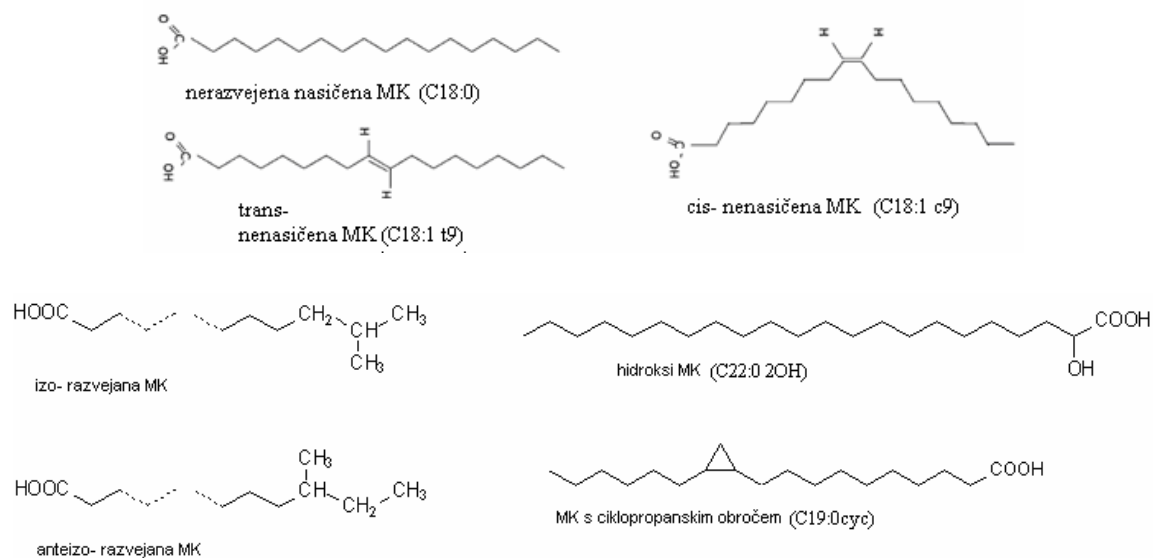
Slika 2: Struktura celične membrane kot fluidnega mozaika (Kaur in sod., 2005)

2.3.1 Struktura in nomenklatura dolgoverižnih MK pri bakterijah

Dolgoverižne MK so karboksilne kisline z alifatsko verigo, dolgo 8 do 10 ogljikovih (C) atomov. Pri numeričnih okrajšavah sta za opis položaja dvojnih vezi in stranskih verig v veljavi dva sistema, kemijsko ali Δ (delta)-poimenovanje in biokemijsko ali n-poimenovanje. V tem delu smo uporabili Δ -poimenovanje, kjer označimo ogljikove atome od karboksilnega konca, tako da ima C atom karboksilne skupine oznako 1, sosednji 2 in tako naprej do zadnjega, ki nosi metilno skupino. Pri n-poimenovanju pa številčimo C atome v nasprotni smeri, od metilnega proti karboksilnemu koncu (Christie, 2003).

Derivate MK lahko glede na število dvojnih vezi in vrsto stranskih skupin razdelimo na nerazvejane nasičene oz. ravne, nenasičene, razvejane, ciklopropanske in hidroksi MK.

Nenasičene MK so pri bakterijah večinoma enkrat nenasičene s sodim številom C atomov. Dvojna vez je lahko na različnih položajih in v dveh oblikah: *cis* ali redkeje *trans* konfiguraciji. Razvejane MK imajo običajno eno metilno skupino in nasičeno verigo. Izo-razvejane MK imajo metilno skupino na predzadnjem C atomu (na drugem C atomu z metilnega konca) in anteizo- razvejane na predpredzadnjem (na tretjem C atomu od metilnega konca). Ciklopropanske MK imajo v verigi ciklopropanski obroč. Sinteza le-tega je postsintetska modifikacija *cis* nenasičenih MK, ki poteka pri nekaterih bakterijah (Kaur in sod., 2005). Hidroksi MK imajo na drugem ali tretjem C atomu vezano hidroksi (–OH) skupino, alifatska veriga pa je običajno nerazvejana nasičena (Christie, 2003).

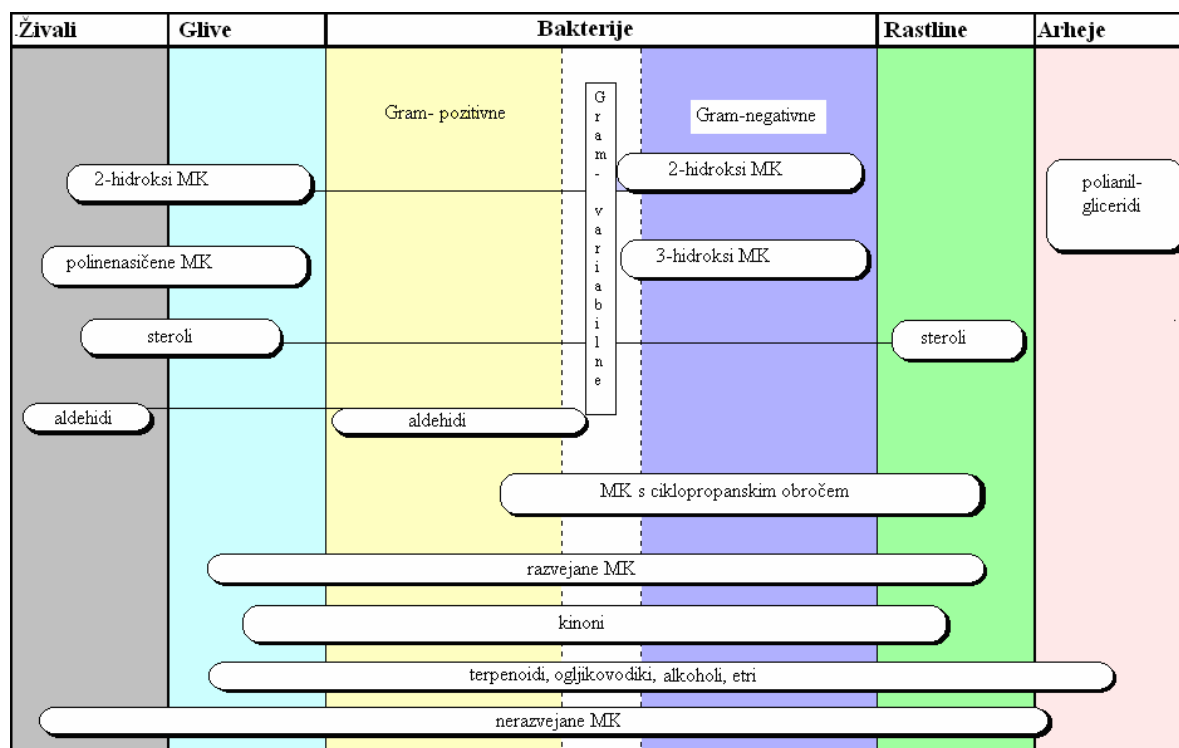


Slika 3: Kemijske strukture nasičene MK, *cis* in *trans* nenasičene MK, razvejane MK, hidroksi MK in MK s ciklopropanskim obročem (Christie, 2007)

2.3.2 Celični profili MK

Celični profili MK se pogosto uporabljajo v kemotaksonomiji bakterij, saj velika raznolikost v strukturi MK zagotavlja razlikovanje bakterij na različnih taksonomskih ravneh in je običajno skladna z izsledki genotipskih analiz. Kot biomarkerji so najpogosteje uporabljene naslednje MK: C15:0 in C17:0 splošno za vse bakterije, za po Gramu pozitivne bakterije izo- in anteizo- C15:0 ter za po Gramu negativne bakterije hidroksi C10:0 in C12:0 MK. Ostale MK so zastopane v različnih skupinah bakterij, npr. MK s ciklopropanskim obročem so v večjem deležu zastopane pri po Gramu negativnih bakterijah, vendar jih najdemo tudi v nekaterih anaerobnih sevih po Gramu pozitivnih bakterij (Kaur in sod., 2005).

Na Sliki 4 je prikazana uporaba MK kot biomarkerjev v kemotaksonomiji.



Slika 4: Shema MK kot biomarkerjev v kemotaksonomiji (Osipov, 2004)

2.3.2.1 Metode, uporabljene za ugotavljanje profila MK

Metod za ugotavljanje profila MK pri bakterijah je več, mi smo uporabili ekstrakcijo MK s pripravo metilnih estrov MK (FAME) in transesterifikacijo s kislim katalizatorjem ter analizo FAME z GC na nepolarni koloni, kar je podrobneje opisano v poglavju Metode in materiali. Druge metode zajemajo transesterifikacijo z bazičnim katalizatorjem (toluen), analizo FAME z GC na polarni koloni ali pa analizo FAME s TLC. Prav tako lahko za ekstrakcijo MK uporabimo druga topila (npr. mešanico klorofor/metanol/pufer) (Kaur in sod., 2005).

2.3.2.2 Celični profil MK bakterije *Pseudomonas putida*

Pseudomonade so ekološko pomembni mikroorganizmi v vodi in tleh in so verjetno odgovorni za razgradnjo številnih topnih snovi, ki izvirajo iz razkroja rastlinskega in živalskega materiala v aerobnih habitatih (Madigan in sod., 2003).

Pseudomonas putida je po Gramu negativna aerobna bakterija, ki glede hranil ni zahtevna in je sposobna za rast izkoriščati različne substrate. Je splošno prisotna v vodnem okolju in v tleh in je kot taka primerna za (mikro)biološke okoljske študije.

Moss je s sodelavci v raziskavi leta 1972 ugotovil, da je profil MK dober taksonomski znak za klasifikacijo nekaterih vrst rodu *Pseudomonas*. Ugotovili so, da se MK C14:0 3OH, ki se pojavlja pri ostalih po Gramu negativnih bakterijah, v primeru rodu *Pseudomonas* pojavi le pri vrsti *P. multivorans*, medtem ko se pri ostalih vrstah rodu *Pseudomonas* ta MK ne pojavi.

Najpomembnejše MK, ki jih ima *P. putida* v svoji membrani so: C10:3OH, C12:0, C12:0 2OH, C12:0 3OH, C14:0, C16:1 c9, C16:0, C17:0cyc, C18:1 c11 in C18:0 (Moss in sod., 1972; Stead, 1992). Heipieper s sodelavci pa je leta 1994 določil kot najpomembnejše MK pri *P. putida* ob rasti na glukozi naslednje MK: C14:0, C16:1 c9, C16:1 t9, C16:0, C17:0cyc, C18:1 c11, C18:1 t11 in C18:0.

2.3.3 Membranski lipidi in homeofazna adaptacija

Membranski lipidi imajo dve pomembni vlogi, preprečujejo prost pretok molekul v in izven celice ter ustvarjajo okolje za potek biokemijskih reakcij (Sinensky, 1974). Njihova pomembna lastnost je, da so takoj po smrti celice razgrajeni, zato z analizo MK analiziramo samo živi in aktivni del biomase, prednost pa imajo tudi v tem, da so ključne komponente membrane, ki odgovarjajo na različne vplive tako iz okolja kot iz notranjosti celice (Kaur in sod., 2005).

Fluidnost membrane predstavlja dinamične lastnosti lipidnih molekul na več ravneh in vključuje rotacije okrog vezi C–C znotraj acilne verige, nihanje in rotacijo molekule MK ter lateralno difuzijo celega lipida (Hazel in Williams, 1990). Biološke membrane so v spremenjenih razmerah rasti sposobne ohranjati fluidnost z mehanizmom homeoviskozne adaptacije (Sinensky, 1974), kar vzdržuje aktivnost različnih membranskih proteinov in permeabilnost membrane na enaki ravni. Homeofazna adaptacija pri bakterijah vključuje spreminjanje vrste MK (s sintezo *de novo* in/ali postsintetskimi spremembami), preoblikovanje molekulskih vrst fosfolipidov (npr. MK se lahko zamenjajo med fosfolipidi brez spremembe v celokupni sestavi MK) in preoblikovanje polarne glave fosfolipida (Isken in de Bont, 1998).

Na spremembe v okolju bakterijska celica največkrat odgovori z regulacijo sestave MK, ki je lahko sprememba razmerja med nenasičenimi in nasičenimi MK, med *cis* in *trans* oblikami, med razvejanimi in nerazvejanimi MK, s spremembo tipa razvejanih MK in s spremembo dolžine acilnih verig (Russell, 1984). Heipieper s sodelavci v raziskavi iz leta 2003 poroča o spremembi v razmerju nenasičenih in nasičenih MK le v primeru dodanih strupenih spojin v koncentracijah, ki popolnoma inhibirajo rast bakterijske kulture.

2.4 STRUPENE SNOVI V OKOLJU IN NJIHOV VPLIV NA SESTAVO MEMBRAN MIKROORGANIZMOV

2.4.1 Vpliv okoljskega stresa na fluidnost celične membrane

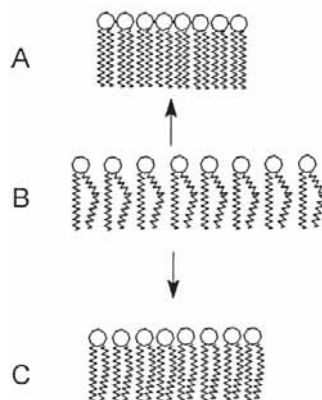
Okoljski stres se največkrat odraža v spremembi fluidnosti membrane. Najpogostejša prilagoditev bakterij na prisotnost membransko aktivne snovi v okolju so spremembe v MK membranskih lipidov. Spremembe se kažejo v *de novo* sintezi MK ali v izomerizaciji dvojnih vezi v MK iz *cis* v *trans*. V rastočih celicah sta možni tako *de novo* sinteza MK kot tudi proces izomerizacije dvojne vezi. Ko pa je rast kulture zaradi prisotnosti visokih koncentracij strupenih spojin inhibirana, poteka le proces izomerizacije, saj je *de novo* sinteza MK inhibirana (Isken in de Bont, 1998; Russell, 1984; Sinensky, 1974; Weber in de Bont, 1996). Ingram v svoji raziskavi iz leta 1976 poroča, kako se je odražala adaptacija *E. coli* na prisotnost alkoholov v okolju na nivoju MK. Alkoholi z 1- 5 C atomov so povzročili povečanje deleža nenasičenih MK (C18:1) in zmanjšanje deleža nasičenih MK (C16:0) ter nato zapolnili prazne prostore v celični membrani, ki so nastali zaradi povečanja deleža nenasičenih MK. Alkoholi z daljšimi verigami (5-10 C atomov) pa so povzročili povečanje deleža nasičenih MK (C16:0) in zmanjšanje deleža nenasičenih MK (C18:1). Tako se je v obeh primerih zmanjšala fluidnost celične membrane.

2.4.1.1 Cis-trans izomerizacija kot odgovor na okoljski stres

Trans nenasičene MK se pri bakterijah redko pojavljajo in so rezultat cis-trans izomerizacije. *Trans* nenasičene MK namreč ne morejo nastati v procesu *de novo* sinteze MK, saj se *trans* oblika dvojne vezi v intermediatu saturira, nenasičena ostane le *cis* oblika (Marrakchi in sod., 2002). Izomerizacijo dvojne vezi iz *cis* v *trans* so do sedaj dokazali le v rodovih *Pseudomonas* in *Vibrio* (Heipieper in sod., 2003).

Pomen izomerizacije je v steričnih razlikah med *cis* in *trans* dvojno vezjo, saj *cis* konfiguracija omogoča večjo fluidnost membrane zaradi večje razvejanosti strukture MK. Medtem ko *cis*

MK s povečanjem fluidnosti membrane omogočijo večjo prepustnost le-te, pa *trans* MK povečajo rigidnost celične membrane, podobno kot nasičene MK, in tako preprečijo vdor toksične spojine iz okolja v celico (Heipieper in de Bont, 1994). Struktura oz. fluidnost lipidnega dvosloja v različnih situacijah je prikazana na Sliki 5.



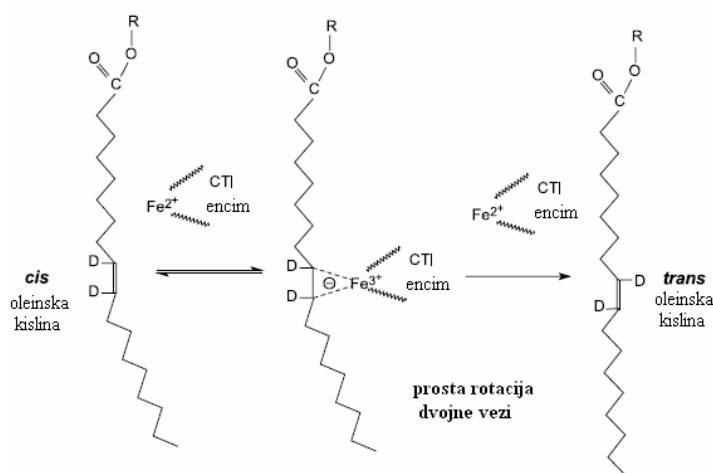
Slika 5: Različna konformacija fosfolipidov in njihov vpliv na strukturo oz. fluidnost lipidnega dvosloja. A: nasičene MK; B: *cis*-nenasičene MK; C: *trans*-nenasičene MK (Ingram, 1976)

Tako so zasledili spremembe v razmerju *trans/cis* mononenasičenih MK kot odgovor na povišano T, prisotne strupene organske spojine, stradanje, znižan pH, osmotski stres in težke kovine. Akumulacija organskih topil, ki se vrinejo v celično membrano, vodi do poškodovanja celične membrane in s tem do nespecifične prepustnosti le-te. Pri tem je motena njena integriteta in s tem funkcija (Heipieper in sod., 2003). Čeprav so organska topila zelo strupena, se vse več sevov prilagaja na rast v njihovi prisotnosti. Največ sevov izhaja iz rodu *Pseudomonas*, ki ima poleg že omenjenega mehanizma adaptacije (povečanje razmerja *trans/cis* zaradi aktivacije *cis-trans* izomerizacije) še prisoten mehanizem aktivnega črpanja prisotnih organskih spojin iz celice (Isken in de Bont, 1998).

Reakcija *cis-trans* izomerizacije poteka z encimom **cis-trans-izomeraza** (CTI). Heipieper in sodelavci so v svoji raziskavi leta 1992 sklepali, da se proces izomerizacije izvaja konstitutivno in ne potrebuje *de novo* sinteze CTI, saj se nivo izomerizacije ob dodatku kloramfenikola ni spremenil. Junker in Ramos sta leta 1999 njihovo sklepanje potrdila z analizo DNK. Proces *cis-trans* izomerizacije teče brez porabe energije v obliki ATP ali potrebe

po kofaktorjih, saj ima reakcija negativno prosto energijo. Prav tako poteka brez spremembe položaja dvojne vezi, kar je bilo dokazano na primeru MK C18:1 c9, ki je po cis-trans izomerizaciji postala C18:1 t9. Reakcija v obratni smeri, torej nastanek *cis* MK iz *trans* MK, bi potrebovala dodatno energijo (Heipieper in de Bont, 1994).

CTI je 87 kDa velik nevtralen protein tipa citokrom c, lociran v periplazmi. V reakciji cis-trans izomerizacije ima pomembno vlogo Fe^{3+} , ki je del domene hema CTI (Heipieper in sod., 2003).



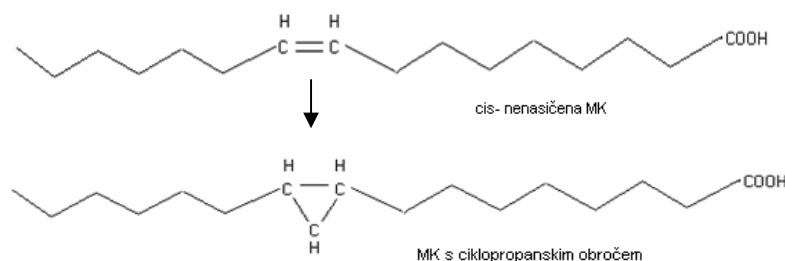
Slika 6: Shema izomerizacije *cis* mononenasičene MK (oleinska kislina) v *trans* obliko z encimom cis-trans-izomeraza (CTI) (Heipieper in sod., 2003)

V raziskavi leta 1999 (Junker in Ramos) so analize DNK pokazale, da je CTI prisotna v vrsti *P. putida* (sevi DOT-T1E^b, P8, 2440, MTB6^b, MTB5, SMO116, F1, JLR11), v nekaterih drugih vrstah rodu *Pseudomonas* (*P. fluorescens* EEZ20, *P. stutzeri* EEZ29, *P. oleovorans*, *P. mendocina* KR1, *P. syringae* pv. *syringae* EEZ30) kot tudi v nekaterih drugih vrstah *Ralstonia solanacearum* EEZ24, *Burkholderia cepacia* CECT322, *Comamonas acidovorans* EEZ23, *Brevundimonas diminuta* CECT313 in *Ralstonia pickettii* CECT330.

Iz raziskave, ki jo je opravil Heipieper s sodelavci leta 1995, je mogoče sklepati, da bi lahko cis-trans izomerizacija pri *P. putida* delovala kot indikator za strupenost organskih spojin. Razmerje trans/cis bi tako lahko postalo ključno v študijah strupenih vplivov okoljskega vzorca.

2.4.1.2 Pojavljanje MK s ciklopropanskim obročem kot odgovor na okoljski stres

V primeru izpostavitve okoljskemu stresu (povišana T, stradanje, znižan pH, prisotne težke kovine ali strupene organske spojine...) so ugotovili tudi povečan delež pojavljanja MK s ciklopropanskim obročem (C17:0 cyc in C19:0 cyc) (Ramos in sod., 1997; Kaur in sod., 2005). CFA-sintaza, encim, ki omogoča nastanek MK s ciklopropanskim obročem iz *cis* nenasičene MK, je prisoten tudi v vrsti *P. putida* (Grogan in Cronan, 1997).



Slika 7: Shema nastanka MK s ciklopropanskim obročem iz *cis* nenasičene MK (Kaur in sod., 2005)

2.4.1.3 Vpliv okoljskega stresa na proteine

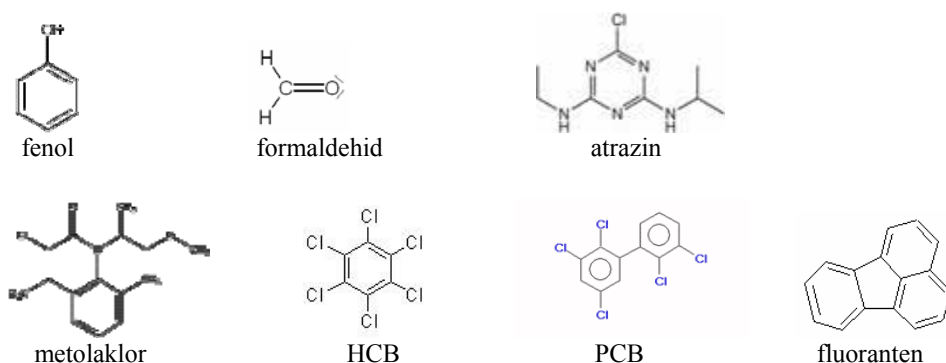
V procesu prilagajanja na okoljske razmere se, poleg sprememb na lipidih, spremembe odražajo tudi na proteinih. Tako se lahko aktivnost proteinov spremeni celo do take mere, da protein izgubi svojo funkcijo (Spector in Yorek, 1985). Heipieper in sodelavci so leta 1996 preučevali vpliv težkih kovin (kot je Zn, Cu, Mn, Cd, Cr, Co, Ni) na sestavo celične membrane in ugotovili, da le-te ne vplivajo na membranske lipide, ampak na membranske proteine, v katerih zamenjajo kovinske kofaktorje. S tem povzročijo spremembe v aktivnosti in/ali konformaciji proteinov ter preko njih vplivajo na spremembe v strukturi celične membrane.

2.4.2 Strupene spojine in njihove lastnosti

Strupene spojine se v okolju skladiščijo, saj je njihova kemična razgradnja ponavadi dolgotrajen proces. Zato je še toliko bolj pomembna biorazgradnja s pomočjo okoljskih mikroorganizmov, ki imajo sposobnost uporabiti nekatere strupene spojine kot vir hranil. Problem pri biorazgradnji predstavlja mešanica onesnaževal v okolju, saj je lahko biorazgradnja ene komponente inhibirana s strani drugih komponent, ki so prisotne v mešanici (Juang in Tsai, 2006). Zaradi dobre topnosti strupenih organskih spojin v nepolarnih topilih in zaradi njihove slabe topnosti v vodi, jih organizmi hitro prevzamejo. Tu se kopičijo in prenašajo naprej v višje trofične nivoje prehranske verige (bioakumulacija in biomagnifikacija) (Connell in Miller, 1984).

Najpogostejša organska onesnaževala so fenol in njegovi derivati. Pseudomonade so sposobne rasti na fenolu, saj ga tolerirajo in ga lahko uporabijo kot vir hranil. Poskusi so pokazali da se prilagoditev kulture *P. putida* na rast na fenolu odraža tudi v profilu MK, poveča se namreč delež 16:0 in 16:1 *trans* MK, ter zmanjša odstotek 16:1 *cis* in 18:1 *cis* MK (Heipieper in sod., 1992). Na mestih onesnaževanja z organskimi spojinami, so pogosto prisotne tudi težke kovine (Heipieper, 1996), med katere spada tudi Hg. Nekateri sevi rodu *Pseudomonas* spp. so sposobni metilacije Hg, ki vodi do nastanka Me_2Hg , kar poteka v anaerobnih okoljih, kot tudi redukcije Hg^+ v hlapni kovinski Hg in demetilacije MeHg v hlapni Hg (Ehrlich, 2002).

Pogosto prisotna onesnaževala v naravi so tudi formaldehid, sintetični klorirani ogljikovodiki (kamor spada PCB), policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH), kamor spada tudi fluoranten (FL), in različni pesticidi. Med najnevarnejšimi pesticidi je vsekakor atrazin, ki se v pripravkih za škropljenje poljščin največkrat uporablja sočasno z metolaklorom (npr. Primextra gold 720 SC). Razgradnja pesticidov je sicer mogoča s strani nekaterih organizmov, vendar lahko ob tem pride do nastanka produktov, ki so bistveno bolj toksični (Connell in Miller, 1984). To se pokaže v primeru razgradnje atrazina, katerega razgradni produkt je desetilatrazin (WHO, 2006). De Souza je s sodelavci v raziskavi leta 1998 ugotovil, da lahko bakterija *Pseudomonas* sp. sev ADP atrazin uporabi kot vir dušika.



Slika 8: Strukturne formule fenola, formaldehida, atrazina, metolaklora, HCB, PCB in fluorantena (Australian Government..., 2007; Ritter in sod., 1995; Ternifi, 1998; U.S. Department of..., 1995; WHO, 2003b)

V Preglednici 1 so prikazane dovoljene koncentracije izbranih strupenih spojin, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, v okolju. Ker določenih informacij nismo mogli pridobiti iz slovenske zakonodaje, smo uporabili tudi informacije iz tuje zakonodaje.

Preglednica 1: Izbrane strupene spojine, ki smo jih uporabili v raziskavi ter njihove dovoljene koncentracije v okolju, ki smo jih dobili iz različnih virov

vir/ toksične snovi	Uredba o kemijskem stanju površinskih voda, 2002 mejne vrednosti (µg/L)	Evropska komisija, 2006 MDK (µg/L)	WHO, 2006 MDK (µg/L)	Avstralian Government, 2007 MDK (µg/L)	European Commission, 2006 DKO (µg/L)
FA	-	-	-	500	-
PH	-	-	-	-	4-20*
Hg	1	0,07	6	-	-
HCB	0,03	0,05	-	-	-
ATR	0,1	2	2	-	-
MET	0,1	-	10	-	-
PCB	0,01	1	-	-	-
FL	0,025	1	-	-	-

MDK- maksimalna dovoljena koncentracija (µg/L)

DKO- dovoljena koncentracija v okolju (µg/L)

* Finska, Španija, Velika Britanija = 20 µg/L; Nemčija, Belgija, Francija, Švica, USA = 19 µg/L;
 Nizozemska = 8 µg/L; Avstrija, Irska, Italija = 7,8 µg/L; Švedska, Danska, Norveška = 4 µg/L

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BAKTERIJA

Vpliv izbranih strupenih spojin na profil MK smo ugotavljali pri bakteriji *Pseudomonas putida* DSM 50026, ki smo jo pridobili iz nemške zbirke mikroorganizmov DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, 1998).

3.2 KEMIKALIJE

Pri delu smo uporabili naslednje kemikalije (v oklepaju je naveden proizvajalec):

- amonij nitrat, NH_4NO_3 (Kemika)
- atrazin (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich)
- bakteriološki agar (Biolife)
- bakteriološki pepton (Biolife)
- BAME – standardna kalibracijska mešanica bakterijskih FAME v metil-kaproatu (Supelco)
- dimetil sulfoksid, DMSO (Aldrich-Chemie)
- glicerol (Sigma)
- fenol (Merck)
- fluoranten (Fluka, Sigma-Aldrich)
- formaldehid (Kemika)
- heksaklorbenzen, HCB (Fluka, Sigma-Aldrich)
- Hg-raztopina, HgCl_2 (Sigma)
- klorovodikova kislina, HCl (Merck)
- MIDI – standardna kalibracijska mešanica FAME v heksanu (Hewlett Packard)
- mesni ekstrakt (Becton Dickinson)
- metanol, za plinsko kromatografijo (Merck)
- metolaklor (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich)

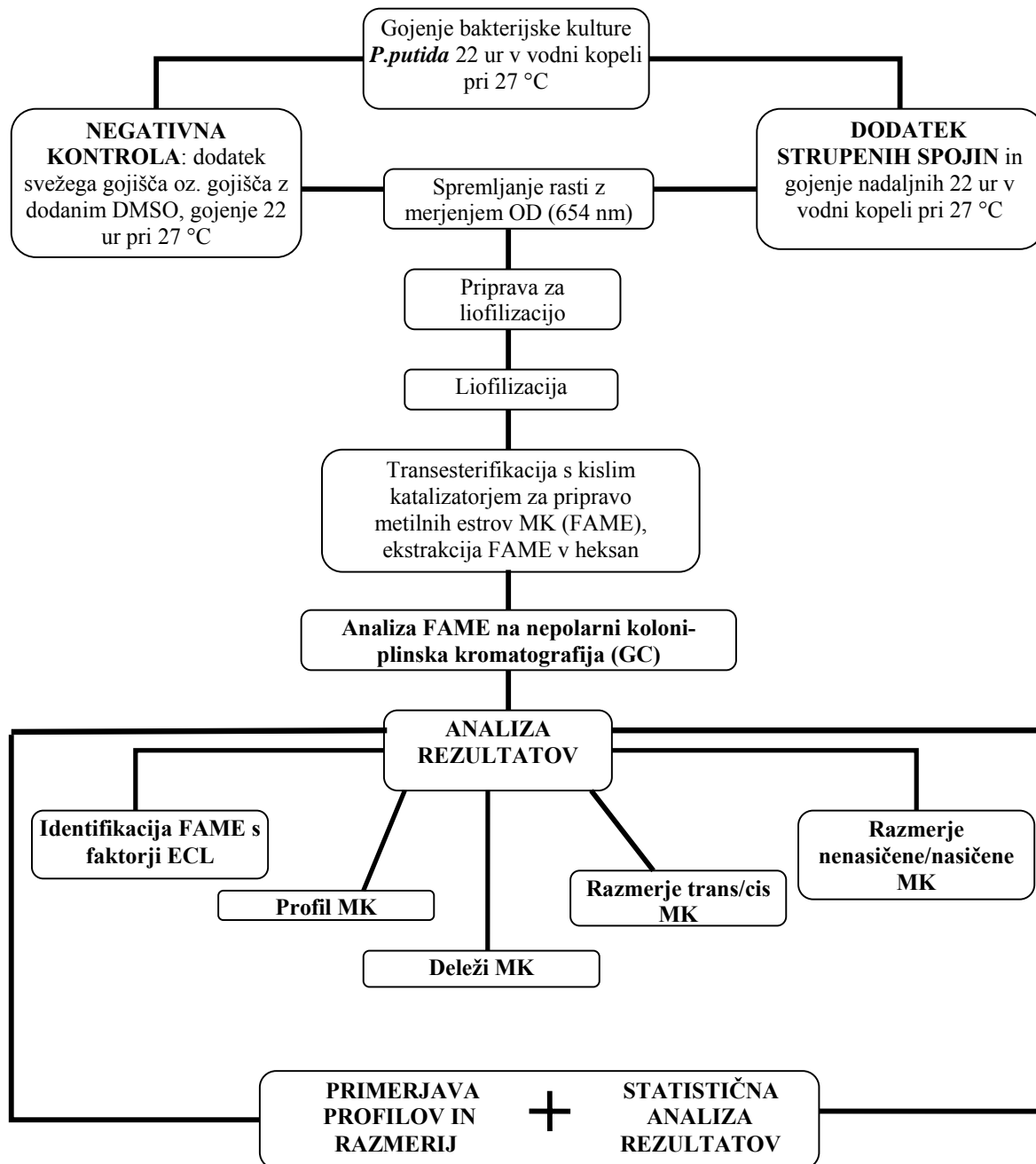
- n-heksan, za plinsko kromatografijo (Merck)
- pentaklorbifenil, PCB (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich)

3.2.1 Izbor strupenih spojin, s katerimi smo preizkušali strupenost na *P. putida*

Spremembe profila MK pri *P. putida* smo sledili po učinkovanju nekaterih poznanih strupenih spojin, ki se pogosta okoljska onesnaževala in za katere so poznani njihovi negativni biološki učinki :

- formaldehid (FA)
- fenol (PH)
- Hg-raztopina (Hg)
- atrazin (ATR)
- metolaklor (MET)
- heksaklorbenzen (HCB)
- pentaklorbifenil (PCB)
- fluoranten (FL)

3.3 POTEK POSKUSOV



Slika 9: Shema poteka poskusov

3.3.1 Gojenje bakterijske kulture *P. putida*

Bakterijsko kulturo *Pseudomonas putida* DSM 50026 smo prejeli v liofilizirani obliki. Iz te oblike smo jo oživili z dodatkom 1 mL testnega gojišča s sestavo: 25 mL raztopine 1, 25 mL raztopine 2 in 50 mL raztopine 3, v 1000 mL destilirane vode.

Sestava posameznih raztopin za pripravo testnega gojišča:

<u>Raztopina 1:</u>	<u>Raztopina 2:</u>	<u>Raztopina 3:</u>
10 g NaNO ₃	36,4 g (D+) glukoza	4 g MgSO ₄ x 7H ₂ O
2,4 g K ₂ HPO ₄	dH ₂ O do 500 ml	0,01 g Fe(citrat) ₃
1,2 g KH ₂ PO ₄		dH ₂ O do 1000 mL
dH ₂ O do 500 mL		

Po oživitvi smo kulturo gojili v gojišču s sestavo: mesni ekstrakt 3 g, bakteriološki pepton 5g v 1000 mL dH₂O. pH smo uravnali na 7,0 z 10mM NaOH. Za pripravo trdnega gojišča smo dodali še 15 g bakteriološkega agarja (DSMZ, 1998).

Nagojeno kulturo smo razdelili v Ependorf epruvete in jih v 15 % glicerolu shranili pri -70 °C (Marinšek Logar, 1997). Shranjena kultura nam je služila kot vir celic za vse eksperimente, ki so sledili.

Bakterijsko kulturo smo pri preizkušanju strupenega delovanja izbranih spojin gojili v zgoraj opisanem gojišču. Po oživitvi bakterijske kulture (gojenje 24 ur pri 27 °C) smo kulturo (po 100 µL) precepili v epruvete (10 mL) in gojili 22 ur pri 27 °C. Po preteku 22 ur smo v epruvete dodali strupene spojine izbranih koncentracij in gojili nadaljnjih 22 ur pri 27 °C.

Poskuse smo izvedli v 3 ponovitvah.

V eksperimentih smo uporabili različne koncentracije izbranih strupenih spojin, ki so predstavljene v Preglednici 2. V razponu uporabljenih koncentracij smo zajeli tudi predpisane dovoljene vrednosti v okolju, ki so prikazane v Preglednici 1.

Preglednica 2: Uporabljene koncentracije izbranih strupenih spojin

spojina / koncentracija ($\mu\text{g/L}$)	1	2	3	4	5	6
formaldehid (FA)	16384	1024	64	6	0,6	
fenol (PH)	16384	1024	64	190	19	1,9
Hg	200,6	20,06	2,006	0,2006		
heksaklorbenzen (HCB)	1000	1	0,1	0,01		
atrazin (ATR)	1000	10	1	0,1	0,01	
metolaklor (MET)	1000	1	0,1	0,01		
pentaklorbifenil (PCB)	1000	10	1	0,1	0,01	
fluoranten (FL)	2000	2	0,2	0,02		

V vsaki seriji uporabljenih strupenih spojin smo pripravili tudi negativno kontrolo (NK). Pri tem smo imeli 2 različni negativni kontroli. In sicer, FA, PH in Hg smo raztopili v gojišču, zato je bila negativna kontrola v teh primerih bakterijska kultura gojena samo v gojišču (brez kakršnihkoli dodatkov). Pri ostalih strupenih spojinah (ATR, MET, HCB, PCB in FL) smo ugotovili slabo topnost v samem gojišču, zato smo jih predhodno raztopili v minimalni količini DMSO. Posledično smo kot negativno kontrolo v teh primerih uporabili kulturo gojeno v gojišču z dodanim DMSO v koncentracijah, ki so bile uporabljene za raztapljanje posameznih spojin (končne koncentracije DMSO v gojišču so se gibale od 0,001 % do 0,02 %). Negativna kontrola je v nadaljevanju označena z NK za primere FA, PH in Hg, v primerih ATR, MET, HCB, PCB in FL pa je označena kot NK z DMSO.

Da bi ugotovili morebitne učinke mešanja strupenih spojin na sestavo celične membrane *P. putida*, smo uporabili tudi mešanice strupenih spojin ter mešanice le-teh z amonijevim nitratom, NH_4NO_3 (Preglednici 3 in 4). Tudi v teh primerih je negativna kontrola označena kot NK z DMSO.

Preglednica 3: Uporabljene mešanice strupenih spojin in njihove koncentracije

	spojina 1	spojina 2
ATR+MET*	ATR	MET
koncentracija ($\mu\text{g/L}$)	1000	1000
ATR+MET**	ATR	MET
koncentracija ($\mu\text{g/L}$)	20	28

* - večje koncentracije spojin v mešanici, ** - manjše koncentracije spojin v mešanici

Preglednica 4: Uporabljene mešanice strupenih spojin z NH_4NO_3 ter njihove koncentracije

mešanica	koncentracije			
	ATR ($\mu\text{g/L}$)	MET($\mu\text{g/L}$)	NH_4NO_3 (mg/L)	DMSO (%)
ATR+ NH_4NO_3 *	1000		100	0,02
ATR+ NH_4NO_3 **	1000		50	0,02
ATR+ NH_4NO_3 ***	1000		20	0,02
MET+ NH_4NO_3 *		1000	100	0,02
MET+ NH_4NO_3 **		1000	50	0,02
MET+ NH_4NO_3 ***		1000	20	0,02
ATR+MET+ NH_4NO_3 *	1000	1000	100	0,02
ATR+MET+ NH_4NO_3 **	1000	1000	50	0,02
ATR+MET+ NH_4NO_3 ***	1000	1000	20	0,02
NH_4NO_3 *			100	
NH_4NO_3 **			50	
NH_4NO_3 ***			20	
DMSO*				0,2
DMSO**				0,02
K				
DMSO + NH_4NO_3 *			100	0,02
DMSO + NH_4NO_3 **			50	0,02
DMSO + NH_4NO_3 ***			20	0,02

* pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 100 \text{ mg/L}$, ** pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 50 \text{ mg/L}$ in *** pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 20 \text{ mg/L}$

Za uporabo teh koncentracij NH_4NO_3 smo se odločili na podlagi zakonodaje, ki določa maksimalno dovoljeno koncentracijo nitratov v vodi 50 mg/L (Uredba o kemijskem stanju površinskih voda, 2002). Preizkusili pa smo tudi večje in manjše koncentracije NH_4NO_3 .

3.3.2 Merjenje optične gostote (OD_{654})

Rast kulture pred in po dodatku strupenih snovi smo spremljali z merjenjem optične gostote (OD) pri valovni dolžini 654 nm na spektrofotometru Novaspec II Visible Spectrofotometer. Ničelno točko smo umerili z gojiščem, v katerem smo gojili kulturo.

Za vsako strupeno spojino in za vsako koncentracijo le-te smo izrisali rastno krivuljo bakterijske kulture.

Nadaljnji postopki so povzeti po Zorec, 2006.

3.3.3 Priprava za liofilizacijo in liofilizacija celic *P. putida*

Po gojenju smo bakterijsko kulturo pripravili za liofilizacijo po naslednjem postopku: bakterijsko kulturo smo iz epruvete prenesli v sterilno epruveto Falcon, centrifugirali 10 min pri 3000 obratih/minuto, odlili supernatant, pelet pa resuspendirali z 1 mL vode miliQ. Resuspendiran pelet smo prenesli v 2 mL-stekleničko za liofilizacijo (Wheaton), jo napolnili s plinskim dušikom in zamrznili pri -20 °C. Kulture smo liofilizirali 24 ur. Po liofilizaciji smo stekleničke zaprli pod plinskim dušikom in tako pripravljene vzorce do nadaljnje analize shranili pri 4 °C.

3.3.4 Priprava metilnih estrov MK in transesterifikacija s kislim katalizatorjem

3.3.4.1 Priprava metilnih estrov MK

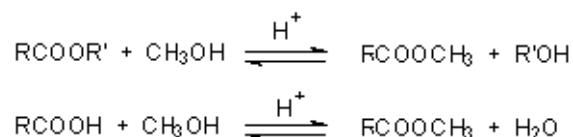
Za analizo dolgoverižnih MK s plinsko kromatografijo smo pripravili njihove metilne estre (FAME) z neposredno metilacijo liofiliziranih celic. Pri postopku smo uporabljali izključno materiale iz stekla in zamaške s teflonskimi tesnili, da smo se izognili kontaminaciji s katalizatorji polimerizacije, ki jih uporabljajo pri izdelavi plastičnih mas.

3.3.4.2 Transesterifikacija s kislim katalizatorjem

Izbrali smo metodo transesterifikacije lipidov s HCl v metanolu (Dionisi in sod., 1999).

Liofilizirane celice smo pretresli v epruveto HACH in dodali 500 µL n-heksana, da smo raztopili lipide. Dodali smo 1 mL 1,5M HCl v metanolu (88 mL metanola + 12 mL koncentrirane HCl) in 1 mL metanola. Epruveto smo napolnili s plinskim dušikom, dobro zaprli in inkubirali 10 minut pri 80 °C. Po končani metilaciji smo reakcijo ustavili z ohlajanjem v ledeni kopeli. Dodali smo 2 mL vode miliQ in močno mešali 1 minuto. Epruvete smo kratko centrifugirali, da sta se fazi ločili. Zgornjo organsko fazo smo prenesli v 1,5 mL

stekleničko za GC analizo, jo napolnili s plinskim dušikom, dobro zaprli in do analize shranili pri -20 °C.



Slika 10: Shema transesterifikacije s kislim katalizatorjem (Christie, 2003)

3.3.5 Analiza FAME na nepolarni koloni

Ekstrate FAME v heksanu smo analizirali na plinskem kromatografu Shimadzu GC-14A z detektorjem FID. Uporabili smo kapilarno kolono Equity-1 (dolžina 30 m, notranji premer 0,25 mm, debelina filma 0,25 µm; Supelco, 28046-U) z nepolarno stacionarno fazo (100 % poli-dimetil-siloksan). Nosilni plin je bil helij (pretok 30 mL/minuto), vodik in zrak pa detektorska plina (pretok H₂ je bil 30 mL/minuto in pretok zraka 300 mL/minuto). Temperatura injektorja je bila 250 °C in temperatura detektorja 280 °C. Analiza je potekala po temperaturnem programu od 150 °C do 250 °C s hitrostjo naraščanja temperature 4 °C na minuto. Začetno temperaturo smo ohranjali 4 minute, končno pa 5 minut. Ročno smo vbrizgali po 1 µL vzorca ali standardne mešanice. Rezultate smo zabeležili na integratorju Chromatopac C-R6A in jih ročno prenesli v program Microsoft Office Excel 2003 za nadaljnjo obdelavo. Izločili smo sestavine, ki so se eluirale pred C10:0 in za C20:0, za sestavine znotraj tega območja pa smo izračunali relativne koncentracije iz površine pika.

3.3.6 Identifikacija FAME s faktorji ekvivalentne dolžine verige (ECL)

Nekatere FAME v vzorcih smo identificirali s primerjavo retencijskih časov (Rt) FAME v standardnih kalibracijskih mešanica (BAME in MIDI). Sestava standardnih mešanica s pripadajočimi Rt je predstavljena v Preglednici 5, slika originalnega kromatograma za standardno mešanico BAME pa je predstavljena v Prilogah A.

Preglednica 5: Vsebnost MK v standardnih mešanica BAME in MIDI in pripadajoči retencijski časi (Rt)

MK	BAME (Rt)	MIDI (Rt)
C9:0		1,99
C10:0		2,47
C11:0	3,23	3,24
C10:0 2OH	3,36	3,36
C10:0 3OH		3,64
C12:0	4,46	4,44
C13:0	6,09	6,10
C12:0 2OH	6,34	
C12:0 3OH	6,85	
C14:0	8,10	8,11
i-C15:0	9,50	
a-C15:0	9,69	
C15:0	10,33	10,33
C14:0 2OH	10,73	10,68
C14:0 3OH/iC16:1	11,41	11,30
i-C16:0	11,81	
C16:1 c9	12,11	
C16:0	12,66	12,66
i-C17:0	14,14	
cyc C17:0	14,62	
C17:0	14,99	14,97
C16:0 2OH	15,44	15,37
cis-9,12 C18:2	16,43	
cis-9 C18:1	16,62	
trans-9 C18:1	16,77	
C18:0	17,29	17,27
cyc C19:0	19,10	
C19:0	19,50	19,47
C20:0	21,64	21,62

Za identifikacijo ostalih FAME smo retencijske čase pretvorili v faktorje ekvivalentne dolžine verige (ECL) po enačbi (Mjøs, 2003) 1:

$$ECL(x) = \frac{\log Rt(x) - \log Rt(z)}{\log Rt(z+1) - \log Rt(z)} + z \quad \dots(1)$$

kjer je $Rt(x)$ retencijski čas sestavine x , $Rt(z)$ retencijski čas nerazvejane nasičene FAME pred sestavino x , $Rt(z+1)$ retencijski čas nerazvejane nasičene FAME za sestavino x in z število C atomov v nerazvejani nasičeni FAME, ki se eluira pred sestavino x . Po definiciji imajo nerazvejane nasičene FAME ECL faktor enak številu C atomov v verigi (npr. ECL (C18:0)=18).

3.3.7 Ovrednotenje rezultatov FAME

FAME smo pri vsakem vzorcu razvrstili po vrstnem redu izločanja na nepolarni koloni (kromatograma standardne mešanice BAME in vzorca HCB3 sta prikazana v Prilogah A) in njihove podatke (retencijske čase in koncentracije) prepisali v program Microsoft Office Excel 2003. Tu smo izračunali delež pojavljanja posamezne MK v vzorcu in pri nadaljnji obdelavi rezultatov upoštevali le MK, katerih delež je bilo večji od 0,5 %. Tem MK smo izračunali pripadajoče ECL faktorje ter jih identificirali s primerjavo MK iz Priloge B. MK, ki so se pojavljale v manj kot 0,5 % smo označili za MK v sledovih in jih pri nadaljnji obdelavi rezultatov nismo upoštevali. MK smo poimenovali z Δ -poimenovanjem.

Za vsako spojino in njeno pripadajočo koncentracijo smo iz rezultatov posameznih ponovitev izračunali aritmetično sredino in standardni odklon od povprečne vrednosti pojavljanja MK. Narisali smo profil MK in ga primerjali z ustrezno negativno kontrolo.

Vsakemu vzorcu smo določili deleže sledečih MK: skupni delež nerazvejanih nasičenih oz. ravnih MK, *cis* in *trans* nenasičenih MK, izo- in anteizo- razvejanih MK, hidroksi MK ter MK s ciklopropanskim obročem. V skupne deleže nismo vključili MK v sledovih.

Izračunali smo tudi razmerje trans/cis MK po enačbi 2 (Heipieper in sod., 1995):

$$\text{razmerje trans / cis} = \frac{(C16 : 1t + C18 : 1t)}{(C16 : 1c + C18 : 1c)} \quad \dots (2)$$

kjer *t* pomeni *trans* obliko in *c* pomeni *cis* obliko dvojne vezi.

Razmerje nenasičenih/nasičenih MK smo izračunali po enačbi 3:

$$\text{razmerje nenasičene/nasičeneMK} = \frac{\sum \text{nenasičeneMK}}{\sum \text{nasičeneMK}} \quad \dots (3)$$

3.3.8 Statistična analiza rezultatov

Domneve o razlikah med aritmetičnimi sredinami posameznih vzorcev v primerjavi z negativno kontrolo smo preverili s *t-testom* pri stopnji značilnosti $\alpha = 0,05$.

t-statistike so bile izračunane v programu Microsoft Office Excel 2003 po formuli, ki ne predpostavlja enakosti vzorčnih varianc:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - \delta_0}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \dots (4)$$

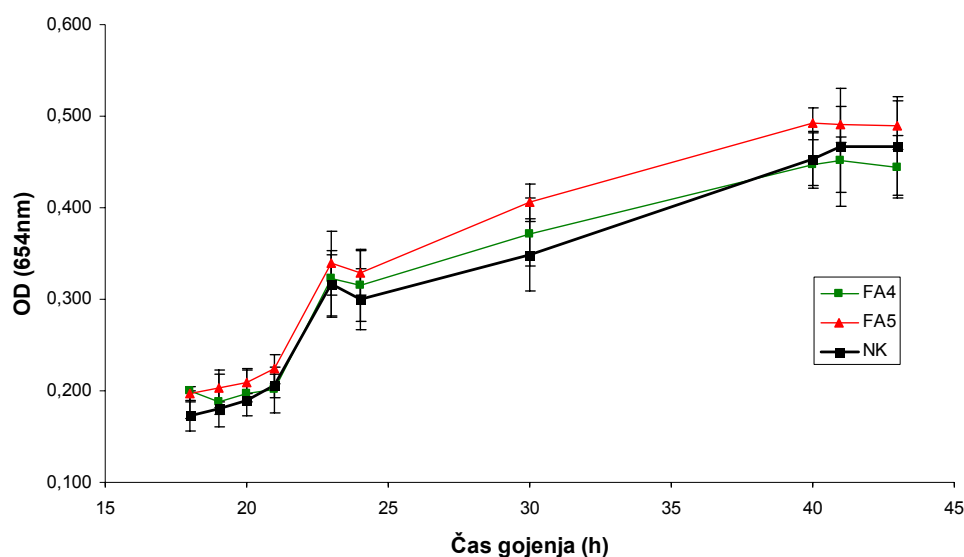
v kateri \bar{x}_1 in \bar{x}_2 predstavljata aritmetični sredini vzorca in negativne kontrole; δ_0 razliko povprečij v ničelni domnevi (v našem primeru enaka 0); s_1^2 in s_2^2 vzorčni varianci; n_1 in n_2 pa velikosti vzorcev (Košmelj, 2001).

4 REZULTATI

4.1 RAST *P. putida* V PRISOTNOSTI IZBRANIH STRUPENIH SPOJIN

Rast *P. putida* opredelimo kot hitrost rasti in sicer kot spremembo v merjeni OD (654 nm) v časovni enoti.

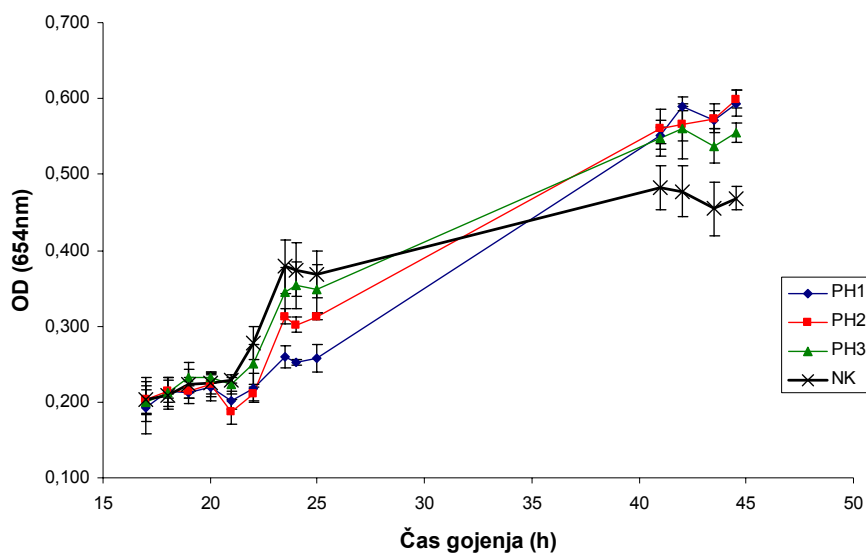
Ugotovili smo, da se rast bakterijske kulture *P. putida* v večini primerov strupenih spojin (FA, Hg, ATR, MET, FL, HCB) ne razlikuje od rasti bakterijske kulture, ki ni bila izpostavljena strupenim spojinam (negativna kontrola), saj se intervali standardnih odklonov le-teh prekrivajo, pa tudi statistična analiza je pokazala, da rast *P. putida* v prisotnosti teh strupenih spojin ni statistično značilno različna od rasti negativne kontrole (NK).



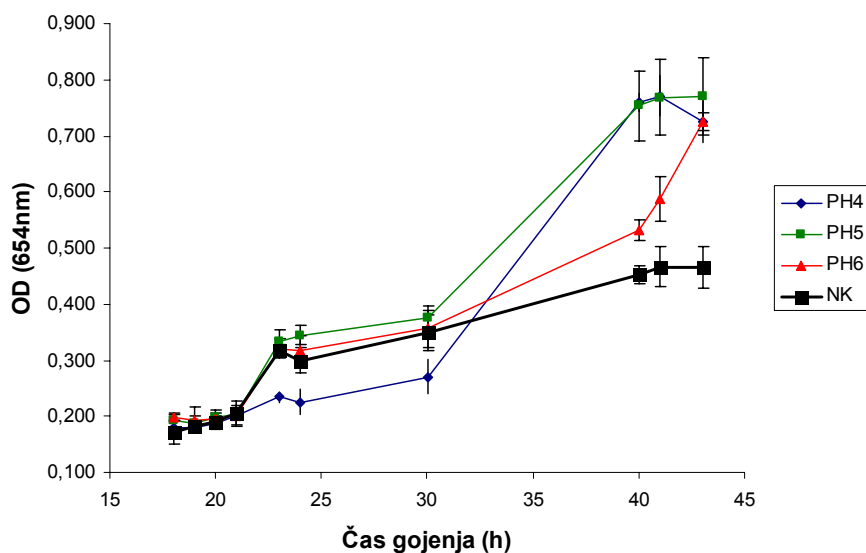
Slika 8: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku formaldehida (FA) v koncentracijah FA4= 6 µg/L in FA5= 0,6 µg/L v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

Na Sliki 11 je prikazan primer rastne krivulje za rast *P. putida* v prisotnosti formaldehida v koncentracijah FA4 in 5. Rast *P. putida* v prisotnosti FA ni statistično značilno različna od rasti NK. Rastne krivulje za ostale spojine so predstavljene v Prilogah C.

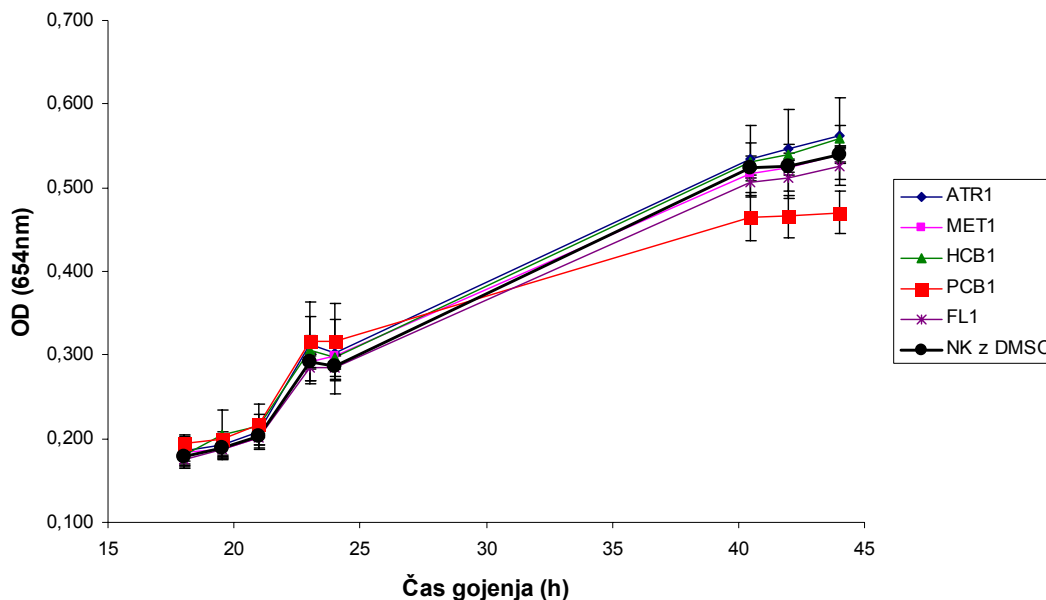
Rast bakterijske kulture *P. putida* v prisotnosti fenola (PH), je statistično značilno večja ($p < 0,05$) od rasti NK pri vseh šestih koncentracijah dodanega PH (Sliki 12 in 13).



Slika 9: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku fenola (PH) v koncentracijah PH1= 16384 $\mu\text{g/L}$, PH2= 1024 $\mu\text{g/L}$ in PH3= 64 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni ($n=3$).



Slika 10: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku fenola (PH) v koncentracijah PH4= 190 $\mu\text{g/L}$, PH5=19 $\mu\text{g/L}$ in PH6= 1,9 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni ($n=3$).

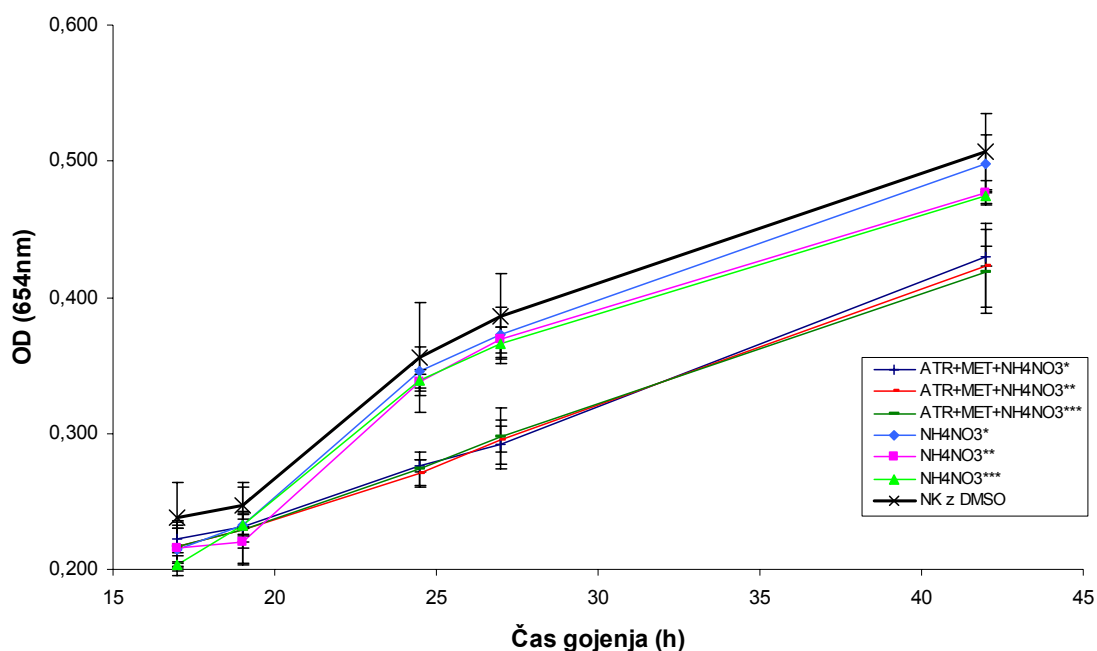


Slika 11: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku ATR (ATR1= 1000 $\mu\text{g/L}$), MET (MET1= 1000 $\mu\text{g/L}$), HCB (HCB1= 1000 $\mu\text{g/L}$), PCB (PCB1= 1000 $\mu\text{g/L}$) in FL (FL1= 2000 $\mu\text{g/L}$) v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni ($n=3$).

Slika 14 prikazuje rast *P. putida* v prisotnosti ATR1, MET1, HCB1, PCB1 in FL1, kjer je opazna zmanjšana rast *P. putida* v primeru dodanega PCB1, medtem ko o razlikah v rasti kulture ob dodatku ostalih strupenih spojin v primerjavi z rastjo negativne kontrole ne moremo govoriti. Statistična analiza je pokazala, da je rast statistično značilno različna ($p < 0,05$) le v primeru dodanega PCB v koncentraciji 1000 $\mu\text{g/L}$.

V primeru dodatka mešanic ATR in MET je opazno prekrivanje intervalov standardnih odklonov v rasti bakterijske kulture *P. putida* v primerjavi z rastno krivuljo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Tudi statistična analiza nam pokaže, da rast ni statistično značilno različna od rasti negativne kontrole. Te rastne krivulje so predstavljene v Prilogah C.

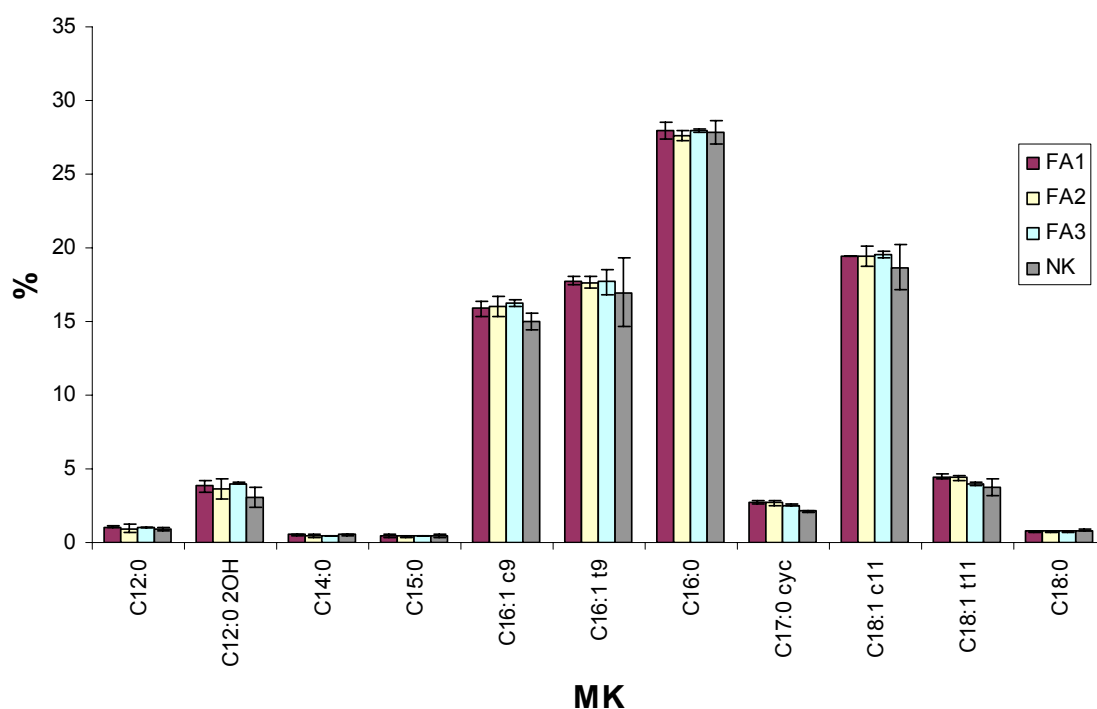
V primeru dodane mešanice ATR+MET+NH₄NO₃ je opazna zmanjšana rast kulture *P. putida* pri vseh treh koncentracijah NH₄NO₃. Rast kulture v tem primeru je statistično značilno različna ($p < 0,05$) od rasti negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Potek rasti je prikazan na Sliki 15.



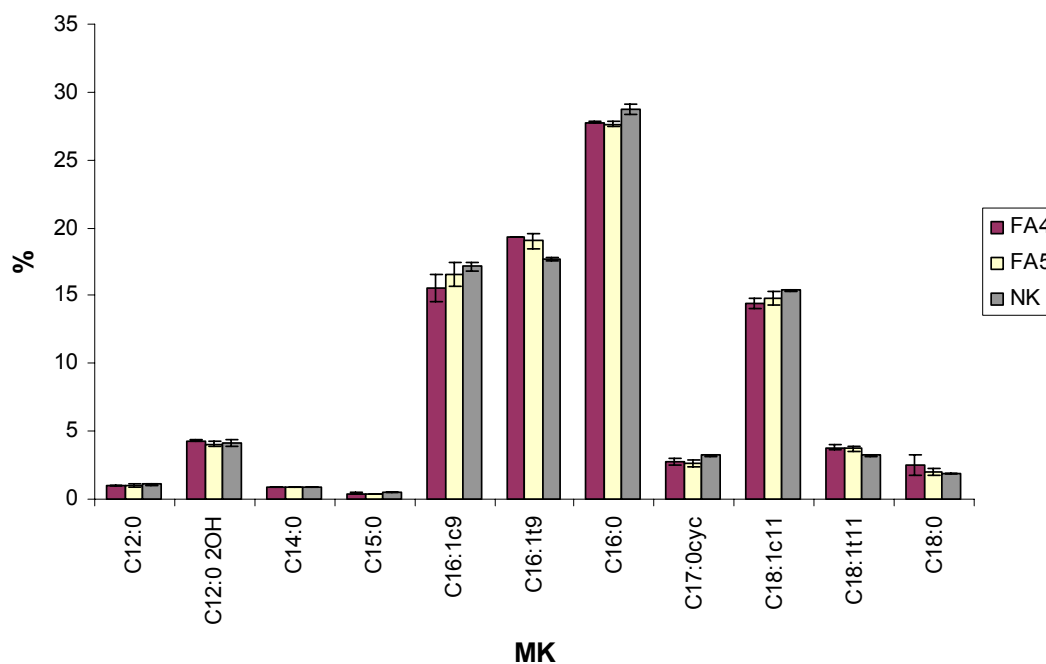
Slika 12: Rast *P. putida* ob dodatku mešanic ATR+MET+NH₄NO₃ (katerih koncentracije so navedene v Preglednici 4) v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO) in kulture *P. putida* gojene v prisotnosti dodanega NH₄NO₃ (v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

4.2 PROFILI CELIČNIH MK PRI *P. putida* OB DODATKU IZBRANIH STRUPENIH SPOJIN IN NJIHOVIH MEŠANIC

V nadaljevanju so prikazani profili MK pri *P. putida* za posamezno strupeno spojino in njej pripadajoče koncentracije v primerjavi z ustrezno negativno kontrolo.

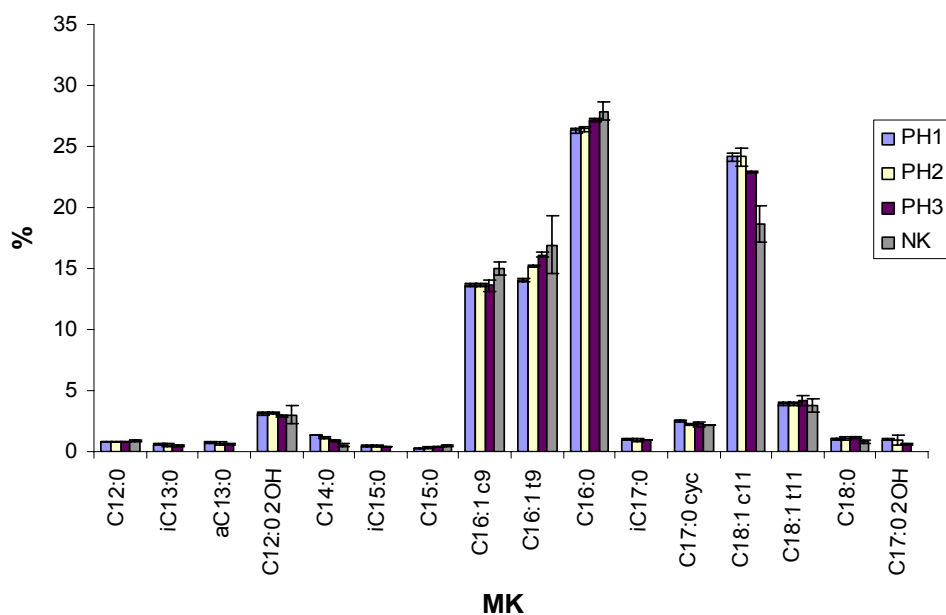


Slika 13: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti različnih koncentracij FA (FA1= 16384 µg/L, FA2= 1024 µg/L in FA3= 64 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

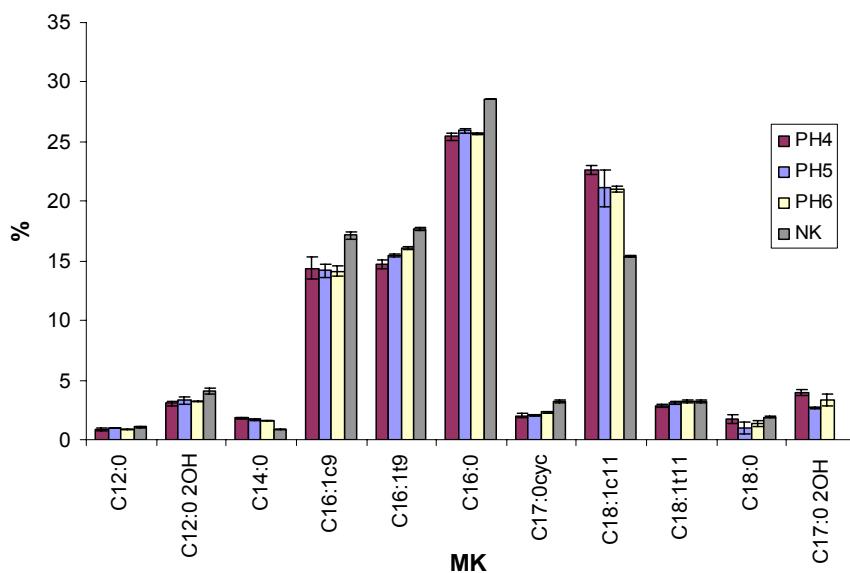


Slika 14: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti formaldehida (FA) v koncentracijah FA4= 6 $\mu\text{g/L}$ in FA5= 0,6 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

Sliki 16 in 17 kažeta, da se profil MK pri *P. putida* v primeru dodanega formaldehida ne razlikuje od profila MK negativne kontrole *P. putida* (NK), saj se intervali standardnih odklonov prekrivajo. Prav tako statistična analiza pokaže, da so v deležu pojavljanja MK ni statistično značilnih razlik.

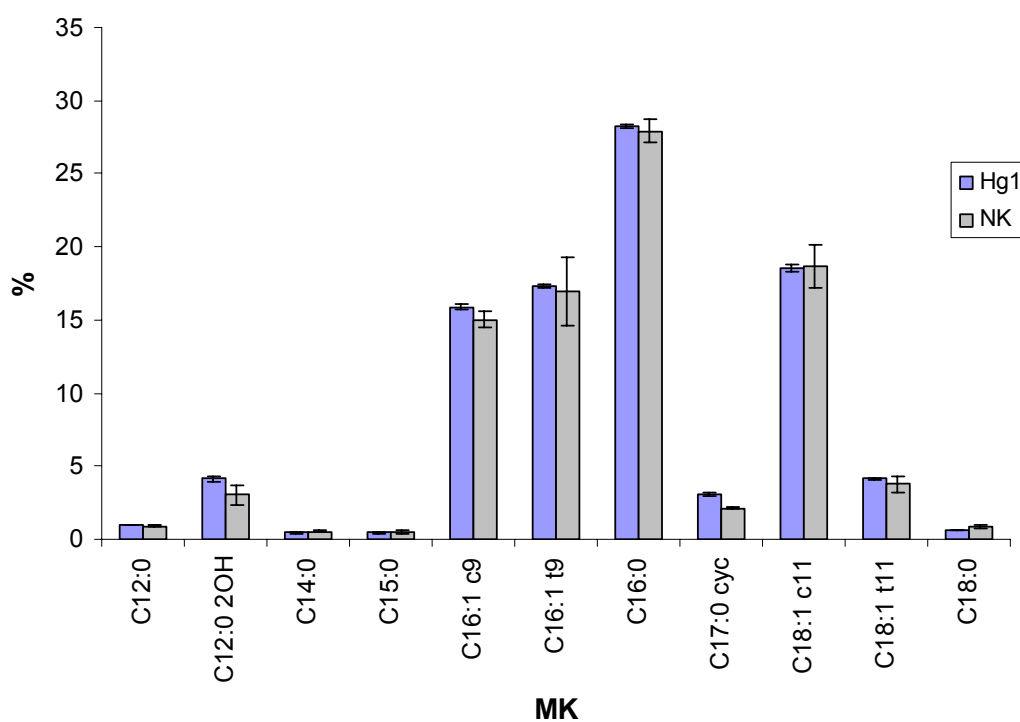


Slika 158: Profili MK pri *P. putida* ob dodanem fenolu (PH) v koncentracijah PH1= 16384 $\mu\text{g/L}$, PH2= 1024 $\mu\text{g/L}$ in PH3= 64 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi s profilom MK negativne kontrole kulture *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

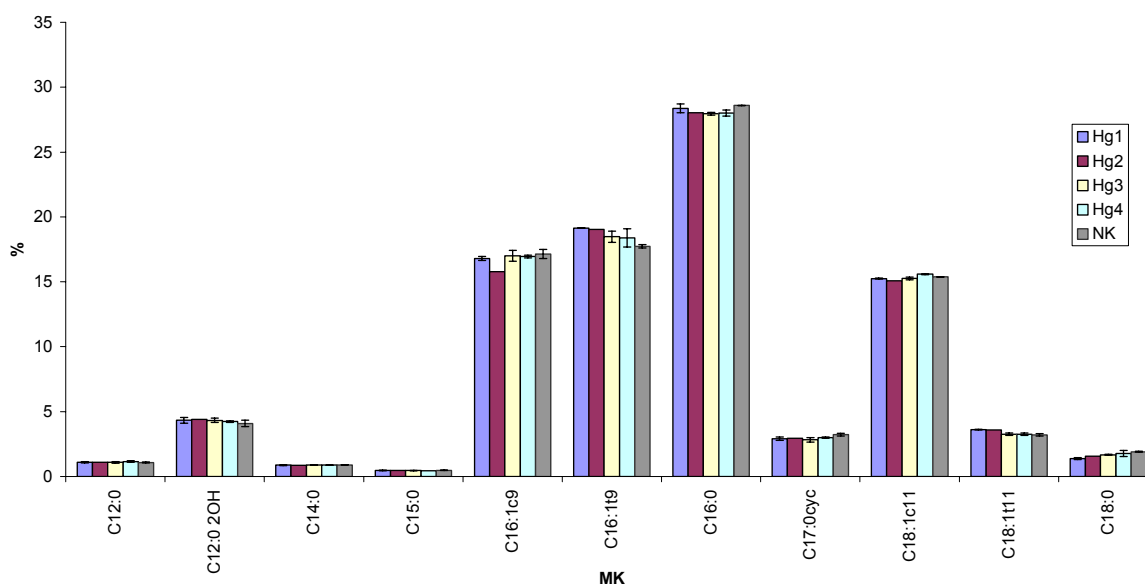


Slika 16: Profili MK pri *P. putida* ob dodanem fenolu (PH) v koncentracijah PH4= 190 $\mu\text{g/L}$, PH5=19 $\mu\text{g/L}$ in PH6= 1,9 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

V primeru rasti ob prisotnosti fenola (Sliki 18 in 19) je opazna razlika v MK C14:0, C16:1 c9, C16:1 t9 in C18:1 c11 pri vseh šestih koncentracijah. Pri koncentracijah PH1, 2 in 3 se pojavijo še MK iC13:0, aC13:0, iC15:0, iC17:0 ter C17:0 2OH, ki pa se v primeru negativne kontrole ne pojavijo. MK C17:0 2OH se pojavi tudi v profilih *P. putida*, ki je bila izpostavljena koncentracijam PH4, 5 in 6. Statistična analiza je potrdila statistično značilnost razlik ($p < 0,05$).



Slika 17: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti Hg v koncentraciji 200,6 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi s profilom negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni ($n=3$).

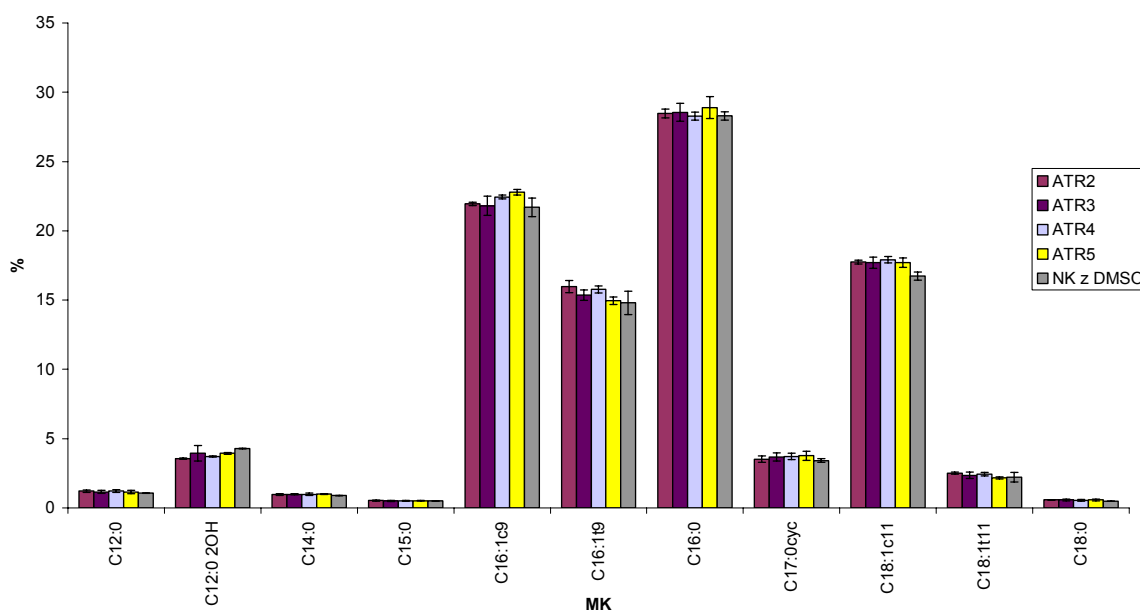


Slika 18: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti Hg v koncentracijah Hg1= 200,6 $\mu\text{g/L}$, Hg2= 20,06 $\mu\text{g/L}$, Hg3= 2,006 $\mu\text{g/L}$ in Hg4= 0,2006 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

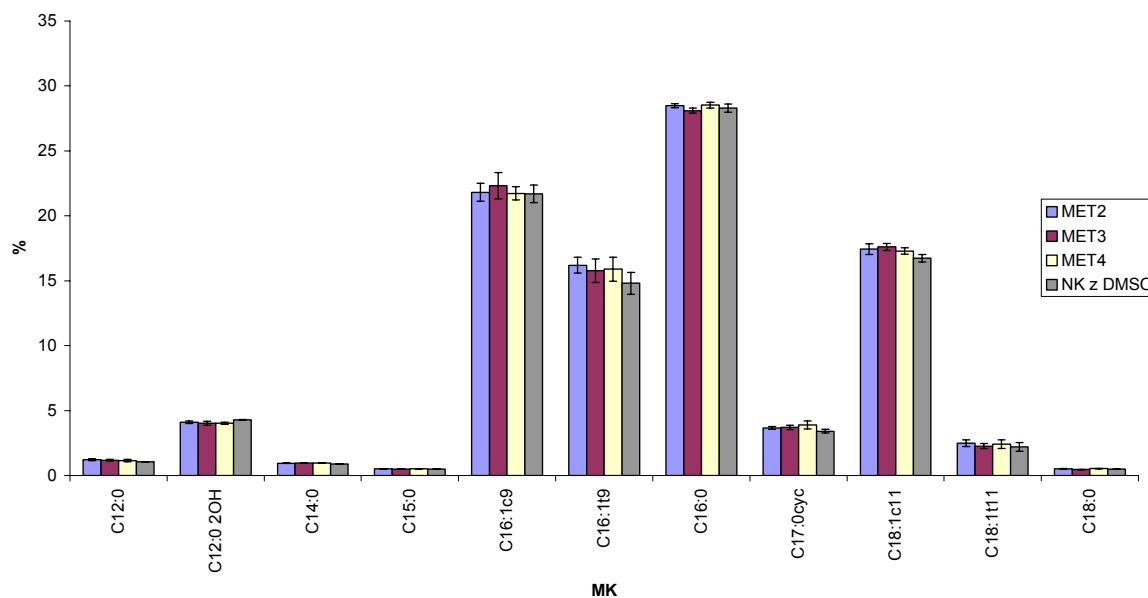
Vpliv Hg na profil MK *P. putida* smo ugotavljali v dveh serijah (Sliki 20 in 21), pri čemer smo v prvi seriji uporabili le koncentracijo 200,6 $\mu\text{g/L}$. V tem primeru ne opazimo razlik v profilu MK pri kulturi gojeni v prisotnosti Hg v primerjavi z NK.

V drugi seriji smo gojili kulturo v prisotnosti štirih koncentracij Hg, in sicer Hg1= 200,6 $\mu\text{g/L}$, Hg2= 20,06 $\mu\text{g/L}$, Hg3= 2,006 $\mu\text{g/L}$ in Hg4= 0,2006 $\mu\text{g/L}$. Tudi v tem primeru ne moremo govoriti o razlikah v deležu pojavljanja MK pri gojenju *P. putida* ob prisotnosti Hg v primerjavi NK.

Delež pojavljanja MK je v obeh serijah pri koncentraciji 200,6 $\mu\text{g/L}$ podoben. Statistična analiza je potrdila, da razlike niso statistično značilne.

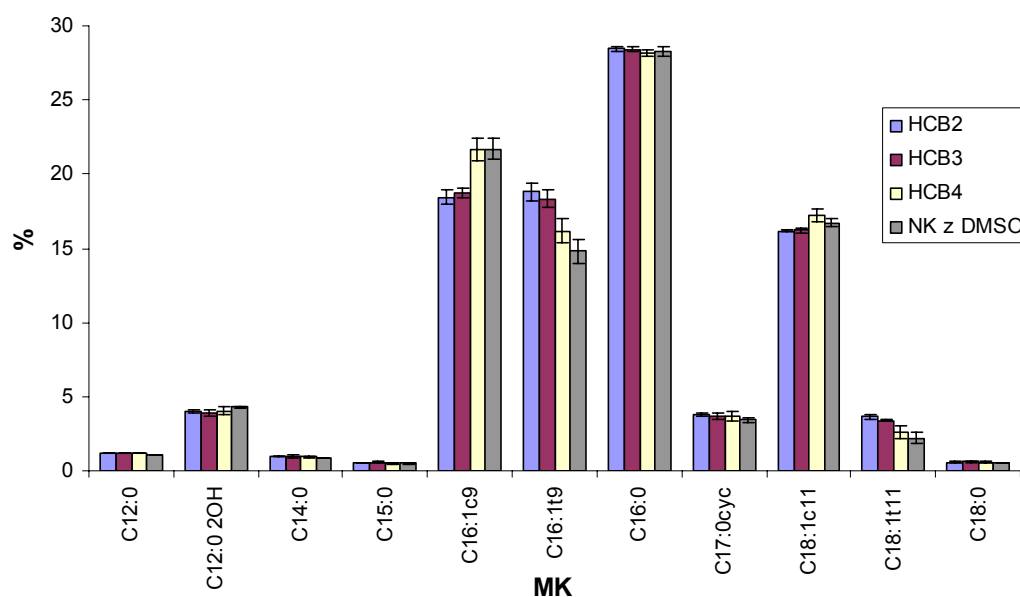


Slika 19: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti različnih koncentracij ATR (ATR2= 10 µg/L, ATR3= 1 µg/L, ATR4= 0,1 µg/L in ATR5= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).



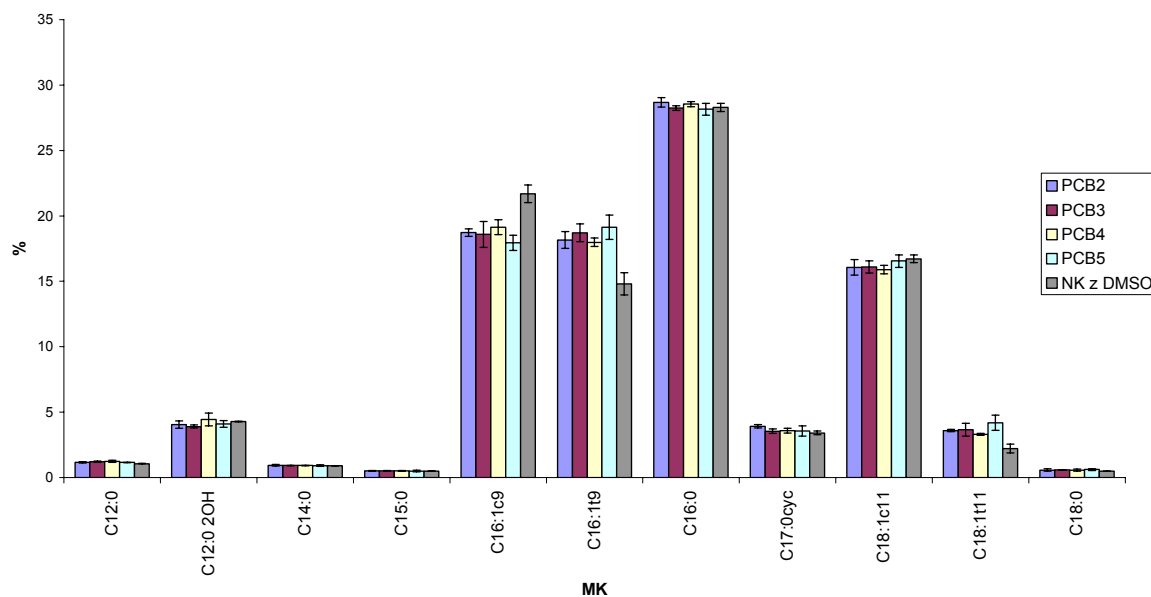
Slika 20: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti različnih koncentracij MET (MET2= 1 µg/L, MET3= 0,1 µg/L in MET4= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

V primeru dodanega ATR v koncentracijah ATR2, 3, 4 in 5 (Slika 22) in MET v koncentracijah MET2, 3 in 4 (Slika 23), zaradi prekrivanja intervalov standardnih odklonov nismo dokazali razlik v deležu pojavljanja MK v primerjavi z negativno kontrolo. Profili MK niso statistično značilno različni.



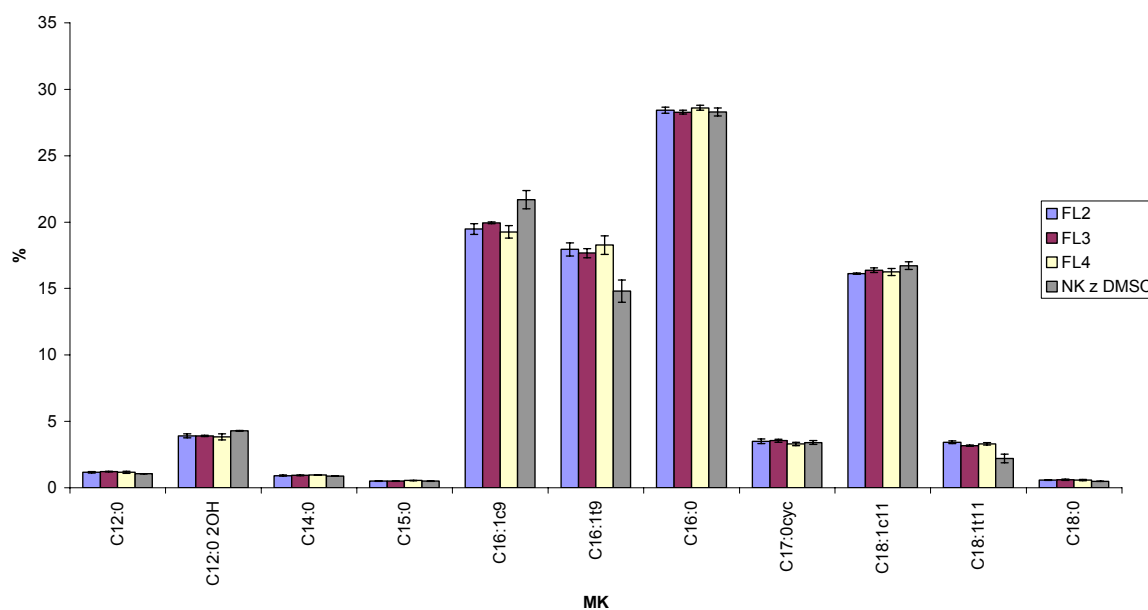
Slika 21: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti različnih koncentracij HCB (HCB2= 1 µg/L, HCB3= 0,1 µg/L in HCB 4= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P.putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

V primeru dodanega HCB se kaže podobnost v deležu pojavljanja MK pri koncentracijah HCB2 in HCB3 ter HCB 4 in negativni kontroli (NK z DMSO) (Slika 24). Razlike so opazne pri MK C16:1 c9 in C18:1 c11, kjer sta deleža pojavljanja teh MK v primeru HCB2 in HCB3 nižja kot v primeru HCB4 in NK z DMSO ter v deležu pojavljanja MK C16:1 t9 in C18:1 t11, ki sta v primeru HCB2 in HCB3 višja kot v primeru HCB4 in NK z DMSO. Statistična analiza je potrdila, da so deleži pojavljanja teh MK statistično značilno različni ($p < 0,05$).



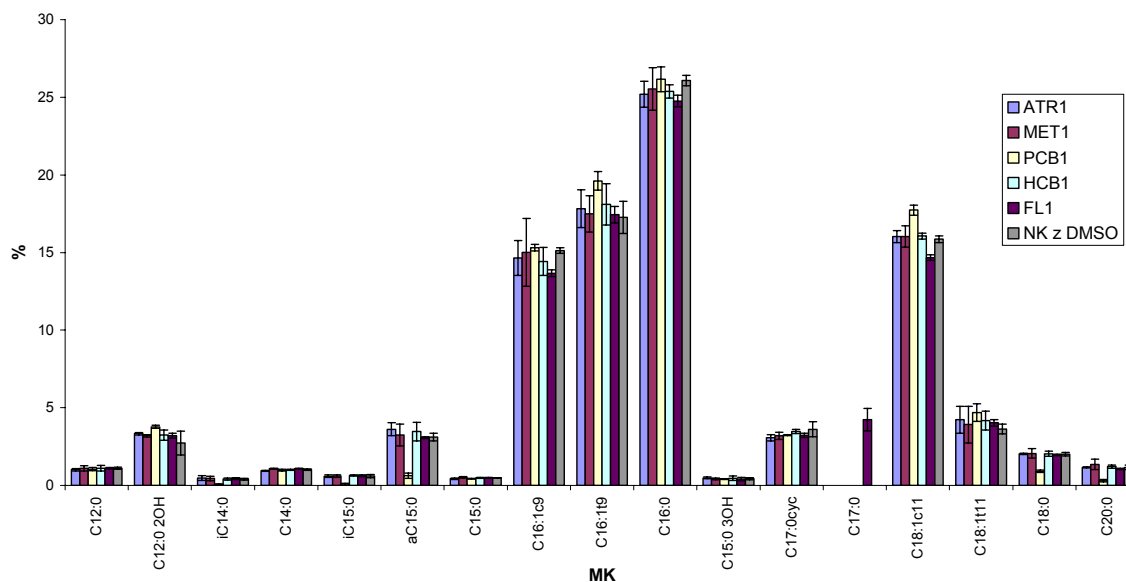
Slika 22: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti različnih koncentracij PCB (PCB2= 10 µg/L, PCB3= 1 µg/L, PCB4= 0,1 µg/L in PCB5= 0,01 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

Slika 25 prikazuje vpliv PCB v koncentracijah PCB2, 3, 4 in 5 na profil MK pri *P. putida*. Opazne so razlike v MK C16:1 c9 ter C16:1 t9, kjer je delež pojavljanja v primeru vseh štirih koncentracij PCB manjši od NK z DMSO za MK C16:1 c9 ter večji od NK z DMSO za MK C16:1 t9. Dokazali smo statistično značilne razlike ($p < 0,05$) teh dveh MK v primerjavi z NK z DMSO, medtem ko med različnimi koncentracijami PCB statistično značilnih razlik za te MK nismo dokazali.



Slika 23: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti različnih koncentracij FL (FL2= 2 µg/L, FL3= 0,2 µg/L in FL4= 0,02 µg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

V primeru dodanega FL (Slika 26) v koncentracijah FL2, 3 in 4 vidimo, da je v primerjavi z NK z DMSO delež MK C16:1 c9 večji in delež MK C16:1 9t manjši. Rezultati so statistično značilno različni za te MK ($p < 0,05$).



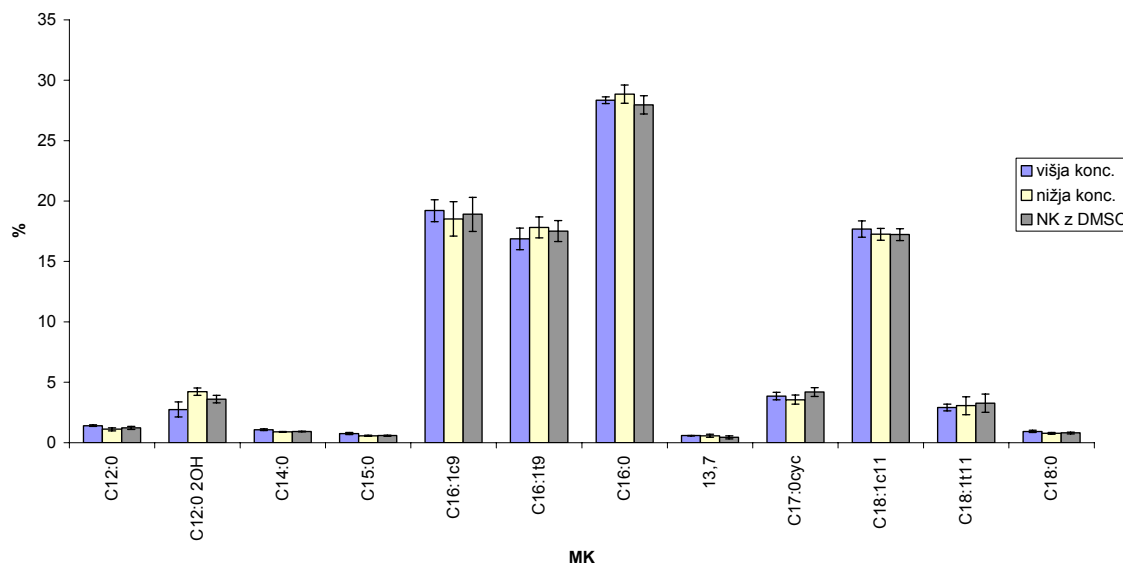
Slika 24: Profili MK pri *P. putida* ob prisotnosti ATR, MET, HCB, PCB in FL v koncentracijah ATR1= 1000 $\mu\text{g/L}$, MET1= 1000 $\mu\text{g/L}$, HCB1= 1000 $\mu\text{g/L}$, PCB1= 1000 $\mu\text{g/L}$ in FL1= 2000 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

Pri dodanih strupenih spojinah v koncentracijah ATR1, MET1, HCB1, PCB1 in FL1 so se profili MK pri *P. putida* spremenili le v primeru PCB1 in FL1 (Slika 27).

Pri koncentraciji PCB1 so v primerjavi s pripadajočo negativno kontrolo opazne naslednje razlike v MK: delež MK iC14:0, iC15:0, aC15:0, C17:0 cyc, C18:0 in C20:0 se v primerjavi z NK z DMSO zmanjša, medtem ko se delež MK C12:0 2OH, C16:1 t9, C18:1 c11 in C18:1 t11 v primerjavi z NK z DMSO poveča.

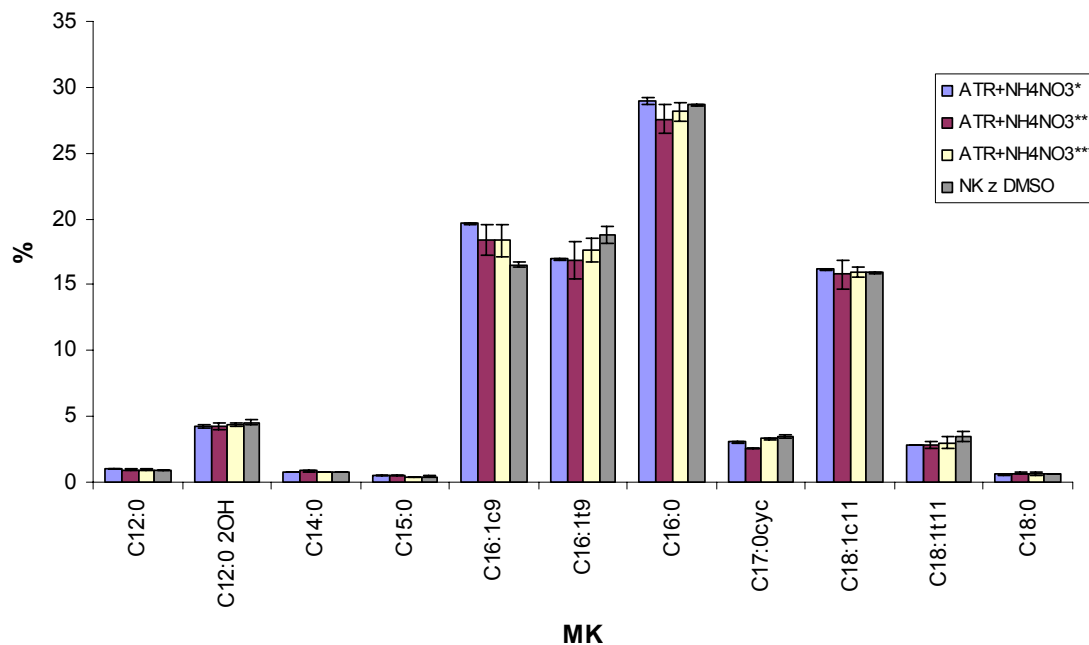
Pri koncentraciji FL1 so v primerjavi NK z DMSO opazne razlike v MK C16:1 c9, C16:0, C17:0, C18:1 c11 in C18:1 t11. MK C18:1 t11 se pojavi v večjem deležu kot pri NK z DMSO, medtem ko se MK C16:1 c9, C16:0 in C18:1 c11 pojavljajo v manjšem deležu kot pri NK z DMSO. MK C17:0 se pojavi le v primeru dodatka FL1, medtem ko se v profilu MK pri NK z DMSO in profilih MK pri dodatku ostalih strupenih spojinah ne pojavi.

Statistična analiza je potrdila, da so rezultati za te MK statistično značilno različni ($p < 0,05$).



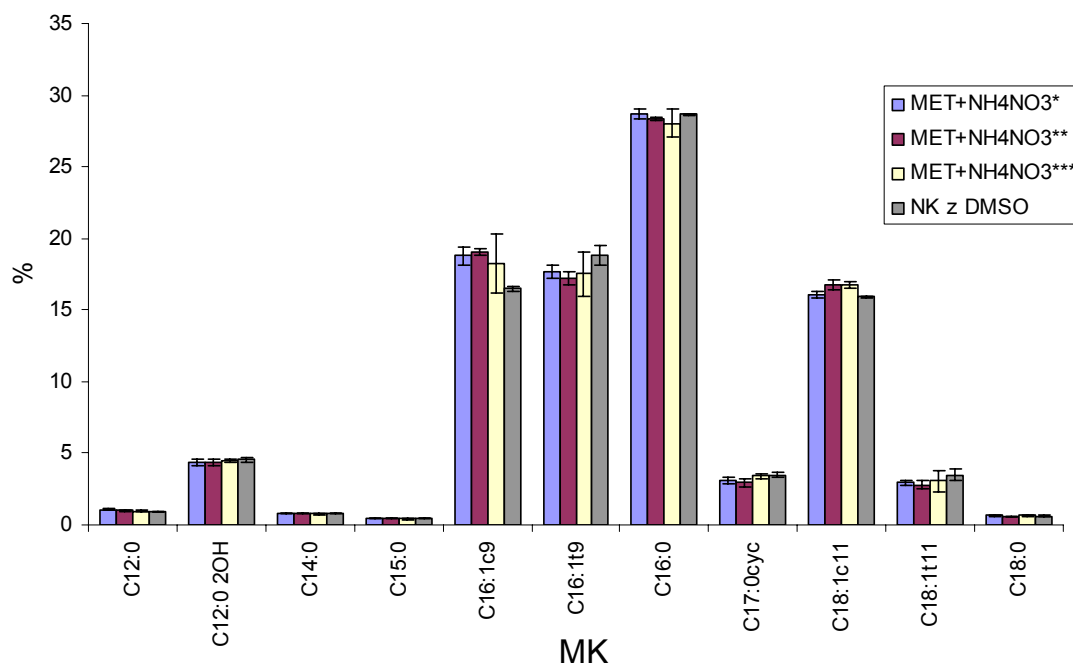
Slika 25: Profili MK pri *P. putida* ob dodatku mešanice ATR+MET v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 3 v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

Slika 28 prikazuje vpliv mešanic ATR+MET v izbranih koncentracijah (Preglednica 3) na profil MK pri *P. putida*. Zaradi prekrivanja intervalov standardnih odklonov nismo dokazali razlik v deležu pojavljanja MK v primerjavi z negativno kontrolo. Rezultati niso statistično značilno različni.



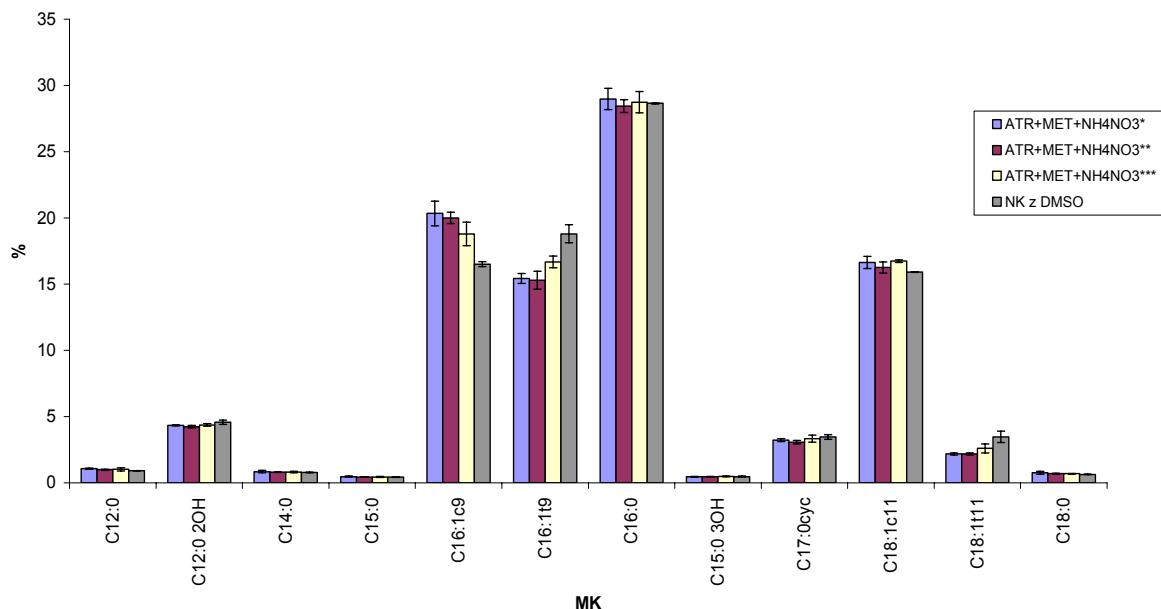
Slika 26: Profili MK pri *P. putida* ob dodatku mešanice ATR+NH₄NO₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4 (* pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 100 mg/L, ** pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 50 mg/L in *** pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 20 mg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

Slika 29 prikazuje vpliv mešanice ATR+NH₄NO₃ v izbranih koncentracijah (Preglednica 4) na profil MK pri *P. putida*. Opazna je le razlika v MK C16:1 t9, ki se v primeru mešanic ATR+NH₄NO₃ pojavi v manjšem deležu kot pri NK z DMSO ter v MK C16:1 c9, katere delež je ob dodatku mešanice večji kot pri NK z DMSO. Pri ostalih MK ni opaznih razlik v primerjavi z NK z DMSO, saj se intervali standardnih odklonov prekrivajo. Statistična analiza je pokazala, da so le v primeru MK C16:1 c9 in C16:1 t9 rezultati statistično značilno različni ($p < 0,05$).



Slika 27: Profili MK pri *P. putida* ob dodatku mešanice MET+NH₄NO₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4 (* pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 100 mg/L, ** pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 50 mg/L in *** pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 20 mg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

Vpliv dodanih mešanic MET+NH₄NO₃ v izbranih koncentracijah (Preglednica 4) na profil MK pri *P. putida* prikazuje Slika 30. Vidimo, da je razlika v primerjavi s profilom MK pri NK z DMSO le v MK C16:1 c9, katere delež se v primerjavi z NK z DMSO poveča ter v MK C16:1 t9, katere delež se v primerjavi z NK z DMSO ob dodatku mešanic MET+NH₄NO₃* in MET+NH₄NO₃** zmanjša. Pri ostalih MK ni opaznih razlik, saj se intervali standardnih odklonov prekrivajo. Rezultati so statistično značilno različni le pri MK C16:1 c9 in C16:1 t9 ($p < 0,05$).

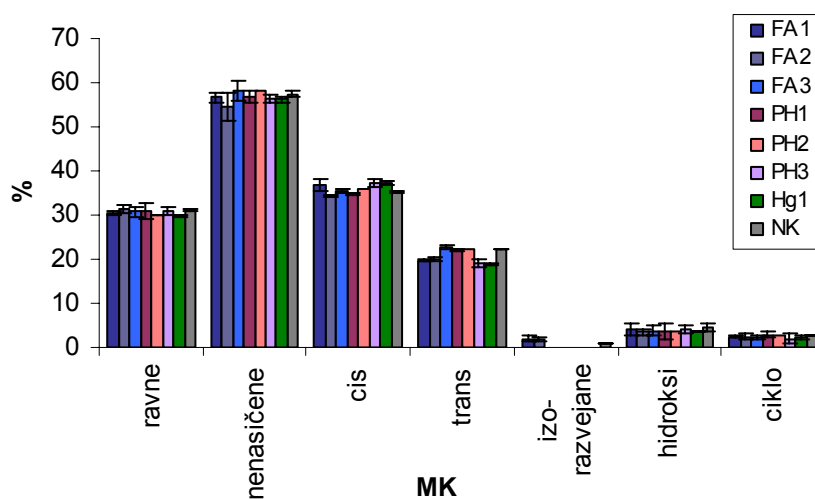


Slika 28: Profili MK pri *P. putida* ob dodatku mešanice ATR+MET+NH₄NO₃ v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 4 (* pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 100 mg/L, ** pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 50 mg/L in *** pomeni koncentracijo NH₄NO₃= 20 mg/L) v primerjavi s profilom MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

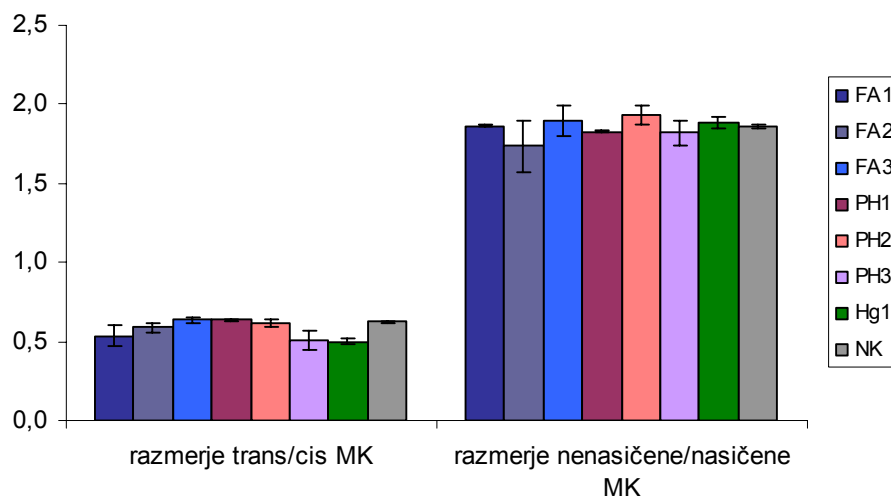
Slika 31 prikazuje vpliv mešanice ATR+MET+NH₄NO₃ v izbranih koncentracijah (Preglednica 4) na profil MK pri *P. putida*. Opazna je razlika le v MK C16:1 c9, katere delež je v primeru ATR+MET+NH₄NO₃ večji kot pri NK z DMSO in MK C16:1 t9, katere delež je v primeru ATR+MET+NH₄NO₃ manjši kot pri NK z DMSO. Vidimo, da je razlika odvisna od koncentracije NH₄NO₃, delež pojavljanja C16:1 c9 MK z nižanjem koncentracije NH₄NO₃ pada, medtem ko delež pojavljanja C16:1 t9 MK z nižanjem koncentracije NH₄NO₃ narašča. Statistična analiza je potrdila, da gre v primeru teh dveh MK za statistično značilno različne rezultate ($p < 0,05$), medtem ko za ostale MK rezultati niso statistično značilno različni.

4.3 DELEŽI MK TER RAZMERJA TRANS/CIS MK IN NENASIČENE/NASIČENE MK

Za vsako spojino in njej pripadajočo koncentracijo smo izračunali vsoto nerazvejanih nasičenih oz. ravnih, nenasičenih, *cis* nenasičenih, *trans* nenasičenih, izo-razvejanih, anteizo-razvejanih, hidroksi in ciklo MK, kar je prikazano na Slikah 32, 34, 36, 38, 40 in 42. Izračunali smo tudi razmerje *trans/cis* MK in razmerje nenasičene/nasičene MK, kar je prikazano na Slikah 33, 35, 37, 39, 41 in 43.



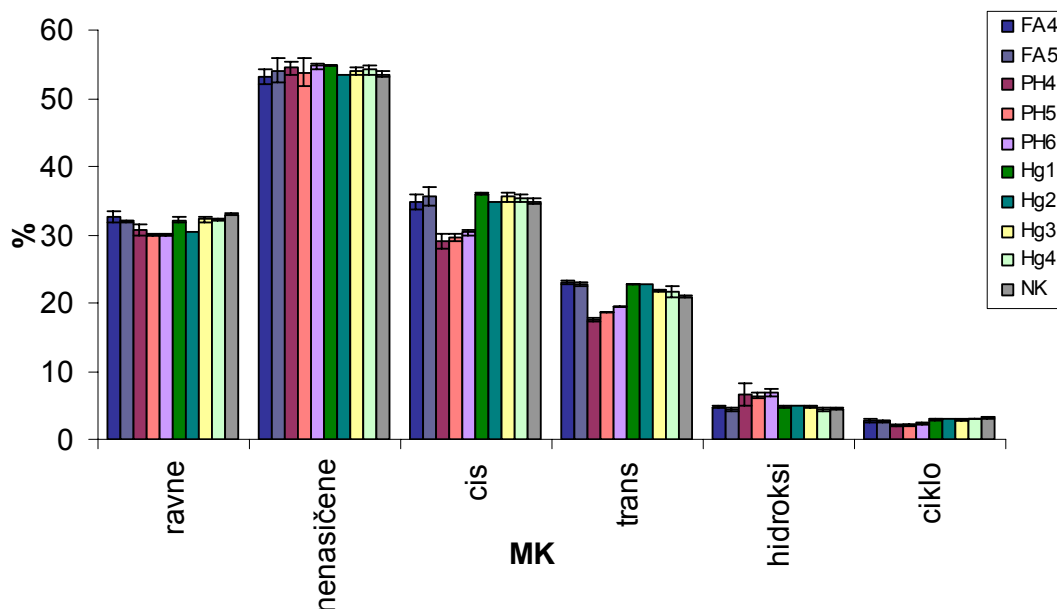
Slika 29: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku FA1, FA2, FA3, PH1, PH2, PH3 in Hg1 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni ($n=3$).



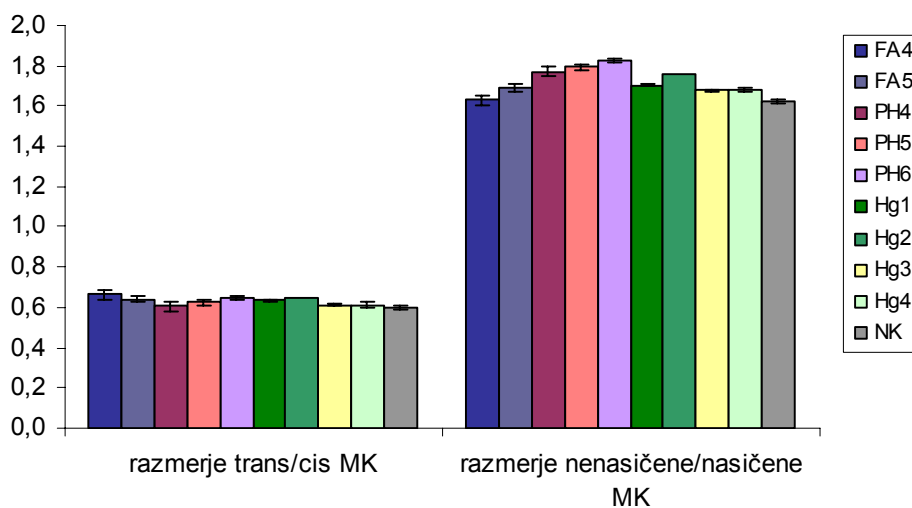
Slika 303: Razmerje trans/cis MK in razmerje nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku FA1, FA2, FA3, PH1, PH2, PH3, Hg1 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni (n=3).

Na Sliki 32 so vidne razlike le v deležih MK ob dodatku PH v koncentracijah PH1, PH2 in PH3 v primerjavi z NK, in sicer se pojavijo anteizo- in izo-razvejane MK. Ob dodatku ostalih strupenih spojin v primerjavi z NK ni opaznih razlik.

Na Sliki 33 vidimo, da se ob dodatku Hg v primerjavi z NK razmerje trans/cis rahlo zmanjša, pri dodatku ostalih strupenih spojin pa ni opazne razlike. Prav tako ni opaznih razlik v razmerju nenasičene/nasičene MK.

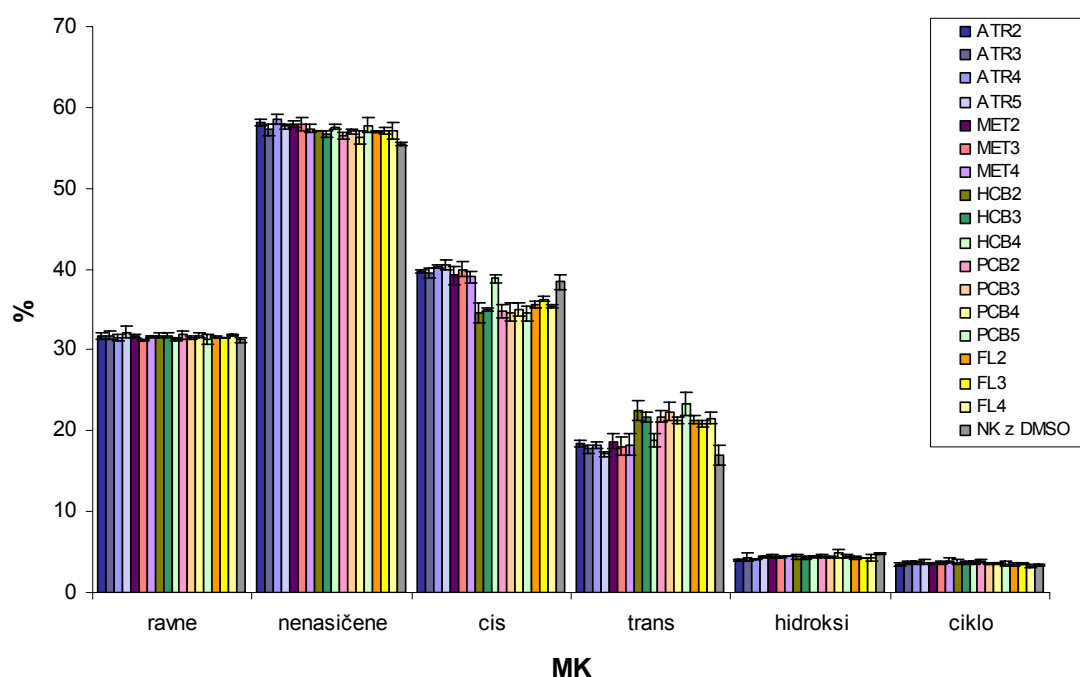


Slika 31: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku FA4, FA5, PH4, PH5, PH6, Hg1, Hg2, Hg3, Hg4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni (n=3).

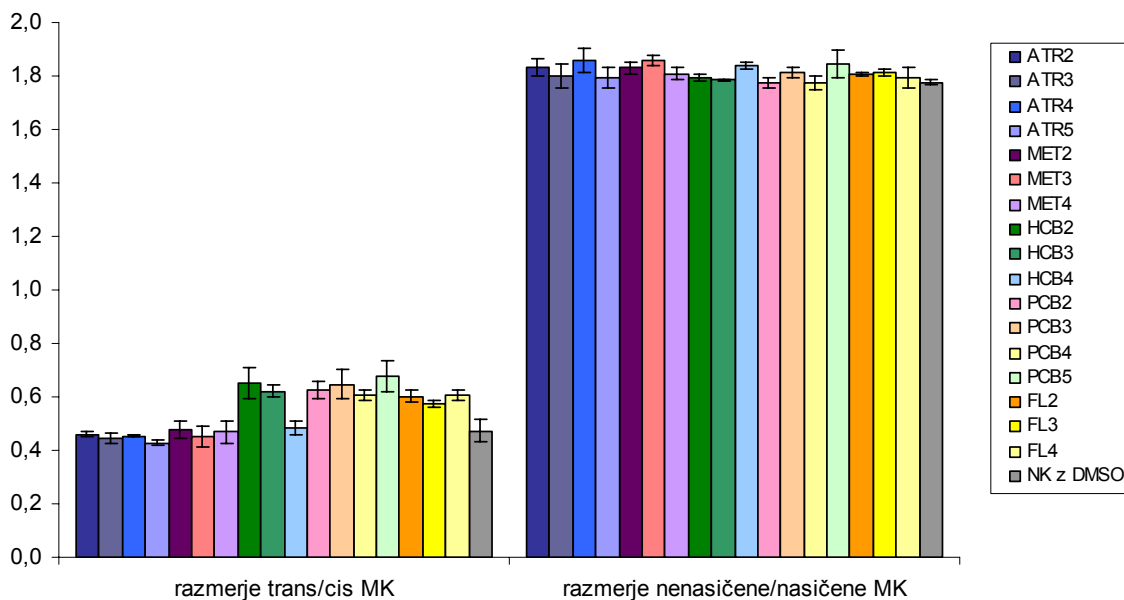


Slika 32: Razmerje trans/cis MK in razmerje nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku FA4, FA5, PH4, PH5, PH6, Hg1, Hg2, Hg3 in Hg4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni (n=3).

Slika 34 prikazuje zmanjšanje deleža *cis* in *trans* nenasičenih MK ob dodatku fenola v koncentracijah PH4, PH5 in PH6 v primerjavi z NK, vendar pa se zaradi tega *trans/cis* razmerje MK v primerjavi z NK ne spremeni (Slika 35), vidimo pa rahlo povečanje razmerja nenasičene/nasičene MK. Sliki 34 in 35 kažeta še, da ni razlik v deležih MK ter v razmerjih *trans/cis* MK in nenasičene/nasičene MK ob dodatku ostalih strupenih spojin.



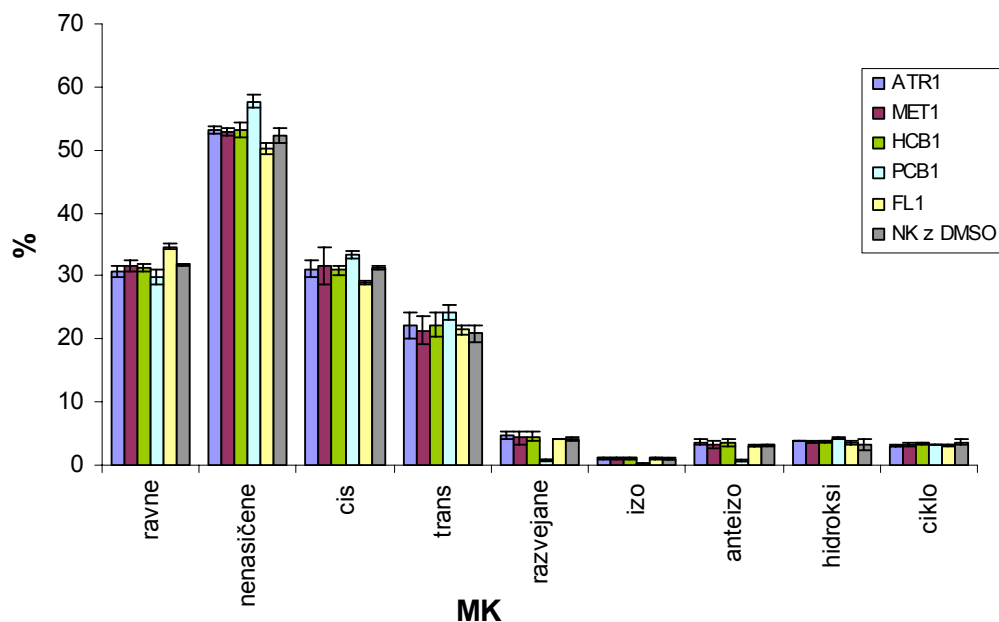
Slika 33: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku ATR2,3,4,5; MET2,3,4; HCB2,3,4; PCB2,3,4,5; FL2,3,4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni (n=3).



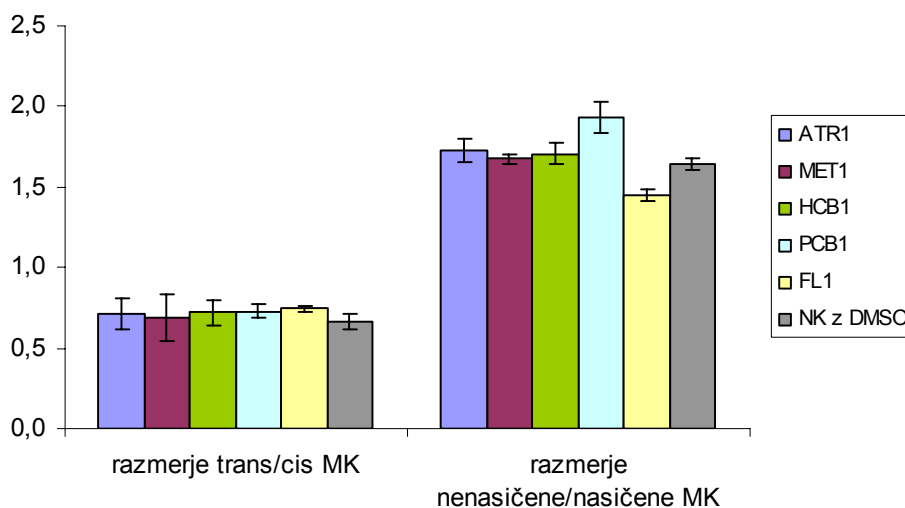
Slika 34: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku ATR2,3,4,5; MET2,3,4; HCB2,3,4; PCB2,3,4,5 in FL2,3,4 (koncentracije so prikazane v Preglednici 2) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni ($n=3$).

Slika 36 prikazuje razlike v deležih MK le v primerih dodanih strupenih spojin HCB2, HCB3, PCB2, PCB3, PCB4, FL2, FL3 in FL4, in sicer se v primerjavi z NK z DMSO delež *cis* MK zmanjša in delež *trans* MK poveča. Pri ostalih MK in ostalih strupenih spojinah ni opaznih razlik v primerjavi z NK z DMSO.

V primerih HCB2, HCB3, PCB2, PCB3, PCB4, FL2, FL3 in FL4 je opazno le povečanje razmerja trans/cis, medtem ko v razmerju nenasičene/nasičene MK ni opaznih sprememb (Slika 37). Prav tako ni opaznih razlik v razmerju trans/cis MK in nenasičene/nasičene MK pri dodatku ostalih strupenih spojin.



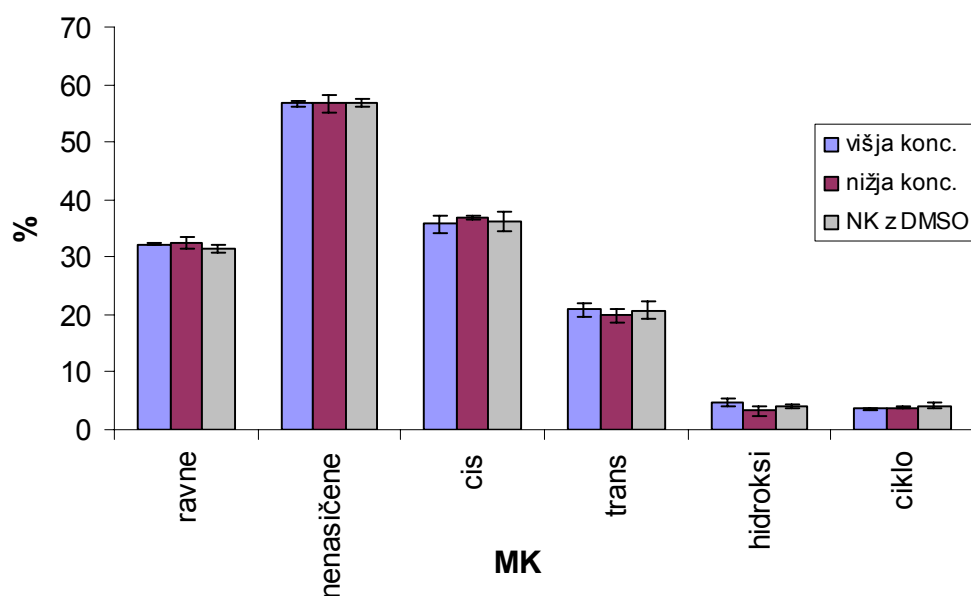
Slika 35: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku ATR1= 1000 µg/L , MET1= 1000 µg/L, HCB1= 1000 µg/L, PCB1= 1000 µg/L in FL1= 2000 µg/L v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni (n=3).



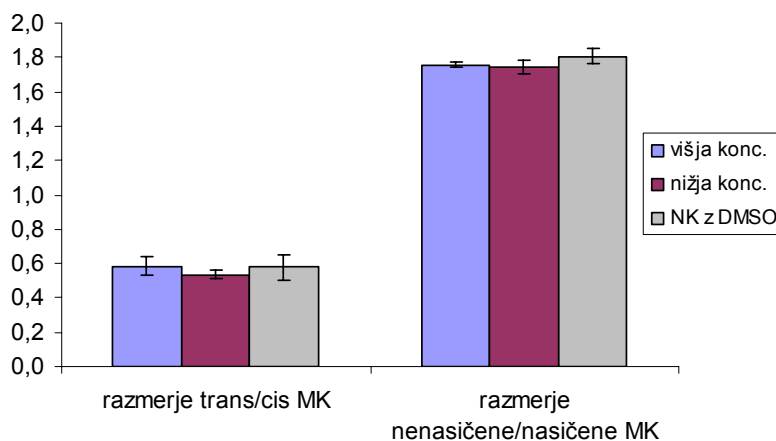
Slika 36: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku ATR1= 1000 µg/L , MET1= 1000 µg/L, HCB1= 1000 µg/L, PCB1= 1000 µg/L in FL1= 2000 µg/L v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni (n=3).

Na Sliki 38 vidimo povečan delež ravnih MK v primeru FL1 ter povečan delež nenasičenih MK in zmanjšan delež razvejanih MK v primeru PCB1. V ostalih primerih ni opaznih razlik v primerjavi z NK z DMSO.

Iz Slike 39 vidimo, da se razmerje nenasičene/nasičene MK v primerjavi z NK z DMSO v primeru PCB1 poveča, v primeru FL1 pa zmanjša. Ob dodatku ostalih strupenih spojin ni vidnih razlik v razmerju trans/cis MK in nenasičene/nasičene MK v primerjavi z NK z DMSO.

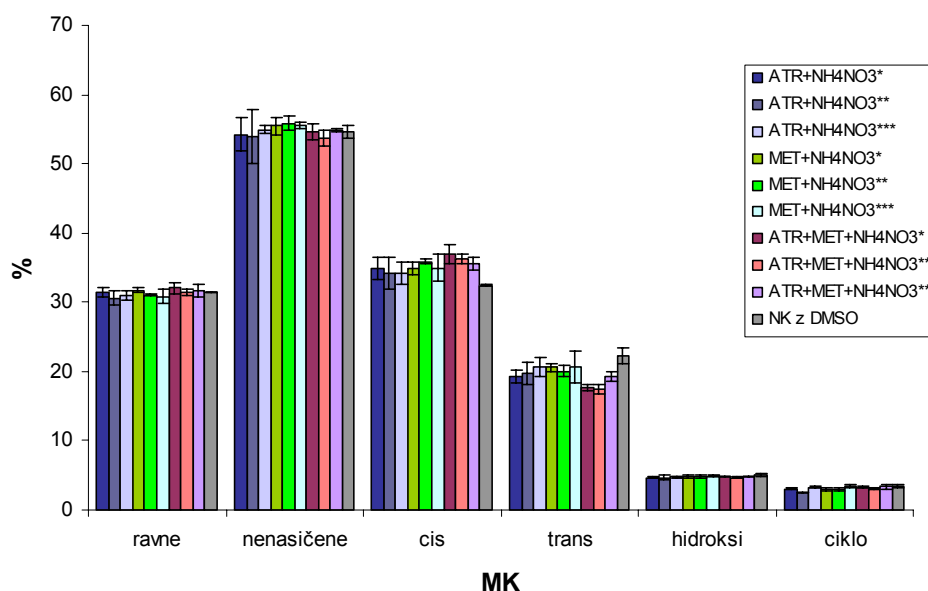


Slika 37: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku mešanice ATR+MET (koncentracije posameznih spojin v mešanici ATR+MET so prikazane v Preglednici 3) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni (n=3).

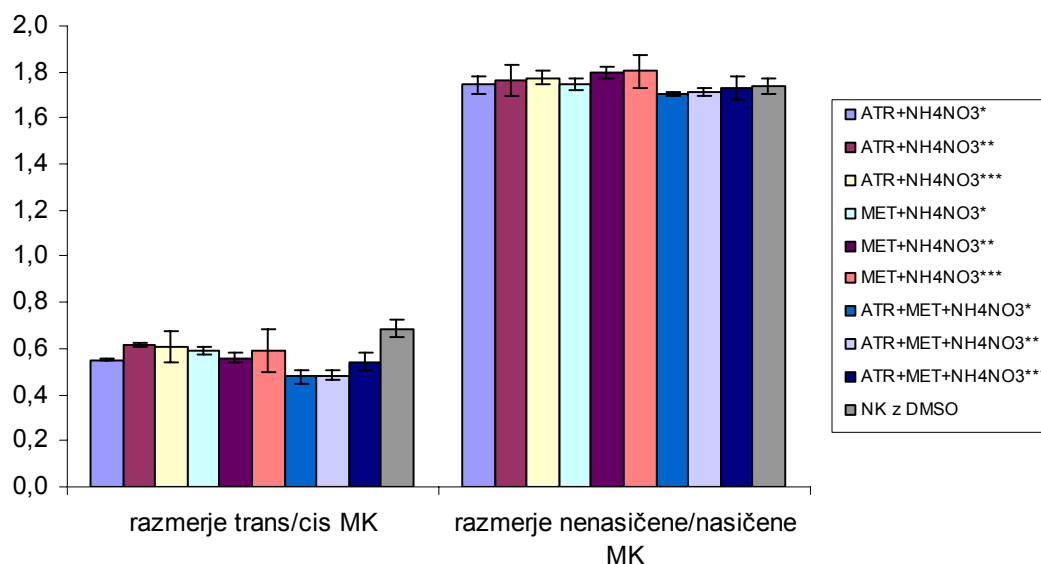


Slika 38: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku mešanic ATR+MET (koncentracije posameznih spojin v mešanici ATR+MET so prikazane v Preglednici 3) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečja ± standardni odkloni (n=3).

Slika 40 ne prikazuje nobenih sprememb v deležih MK ob dodatku mešanice ATR+MET (koncentracije so prikazane v Preglednici 3) v primerjavi z NK z DMSO, zato tudi ni opaznih sprememb v razmerju trans/cis MK in v razmerju nenasičene/nasičene MK (Slika 41).



Slika 39: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃, ATR+MET+NH₄NO₃ (koncentracije mešanic so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).



Slika 40: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃, ATR+MET+NH₄NO₃ (koncentracije mešanic so prikazane v Preglednici 4) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje ± standardni odkloni (n=3).

Slika 42 prikazuje razlike v deležu *cis* MK, ki je pri dodatku mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃, ATR+MET+NH₄NO₃ večji kot pri NK z DMSO in v deležu *trans* MK, ki je manjši kot pri NK z DMSO.

Slika 43 prikazuje, da v razmerju nenasičene/nasičene MK ni opaznih razlik pri dodatku mešanic v primerjavi z NK z DMSO. Opazno je le zmanjšanje razmerja trans/cis MK v primeru dodane mešanice ATR+MET+NH₄NO₃.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Prisotnost strupenih spojin v okolju lahko zaznavamo z različnimi kemijskimi metodami. Ker pa nas poleg same prisotnosti strupene spojine zanima tudi kakšne (negativne) učinke ima ta strupena spojina na žive organizme, se poslužujemo tudi bioloških testov. Z njimi zaznamo sicer le biodostopni delež neke strupene spojine v okolju, vendar je ta glede na vpliv na organizme pomembnejši kot celokupna koncentracija, ki jo izmerimo s kemijskimi metodami. V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv izbranih strupenih spojin v različnih koncentracijah ter njihovih mešanic na spreminjanje celičnega profila MK pri bakteriji *Pseudomonas putida* DSM 50026. Strupene spojine smo izbrali glede na njihovo pogosto pojavljanje v okolju in glede na znane podatke o njihovih negativnih bioloških učinkih. V območje izbranih koncentracij strupenih spojin smo zajeli njihove dovoljene koncentracije v okolju, ki jih predpisuje slovenska in/ali tuja zakonodaja (Preglednica 1).

Z merjenjem optične gostote (OD_{654}) smo spremljali tudi rast bakterijske kulture *P. putida* ob izpostavitvi izbranim strupenim spojinam. Rezultati so pokazali, da se rast kulture ob prisotnosti strupenih spojin v izbranih koncentracijah ni razlikovala od rasti negativne kontrole v primeru naslednjih strupenih spojin: formaldehid (FA), Hg, atrazin (ATR), metolaklor (MET), heksaklorbenzen (HCB) in fluoranten (FL) (Slika 12; Priloge C). V primeru dodanega fenola (PH) smo potrdili dejstvo, da so pseudomonade sposobne rasti na fenolu (Neumann in sod., 2004; Juang in Tsai, 2006), saj je rast ob dodatku PH večja v primerjavi z negativno kontrolo (NK) (Sliki 13 in 14). In sicer, v koncentracijah manjših od 190 $\mu\text{g/L}$ je rast večja že takoj po dodatku PH in cel čas izpostavitve (Slika 14), medtem ko je ob dodatku PH v koncentracijah večjih od 190 $\mu\text{g/L}$ vidna začetna zmanjšana rast kulture v primerjavi z NK, končni nivo rasti pa je v primerjavi z NK večji (Sliki 13 in 14). Iz tega sklepamo, da PH v koncentracijah večjih od 190 $\mu\text{g/L}$ sprva deluje na rast zaviralno, sčasoma pa se kultura prilagodi na dodane količine PH in začne izkoriščati PH kot vir hranil. Ob prisotnosti PCB se je rast *P. putida* v primerjavi z negativno kontrolo (NK z DMSO) rahlo zmanjšala le ob dodatku PCB v koncentraciji 1000 $\mu\text{g/L}$ (Slika 15). Prav tako se je zmanjšala rast *P. putida* ob

dodatku mešanic ATR+MET+NH₄NO₃ v primerjavi z negativno kontrolo (NK z DMSO) (Slika 16). Primerjava rasti kulture ob dodatku mešanice ATR+MET+NH₄NO₃ z rastjo kulture ob dodatku NH₄NO₃ (Slika 16) in z rastjo kulture ob dodatku mešanice ATR+MET (Priloga C9) v istih koncentracijah, kaže, da prisotnost NH₄NO₃ povzroči negativen učinek mešanice ATR+MET na rast kulture.

Na spremembe v okolju bakterijska celica največkrat odgovori z regulacijo sestave MK. S povečanjem rigidnosti oz. zmanjšanjem fluidnosti celične membrane, se celica brani pred vdorom strupenih spojin vanjo (Isken in de Bont, 1998). Fluidnost membrane lahko celica zmanjša na ravni MK na naslednje načine: s povečano sintezo MK z daljšimi acilnimi verigami, z zmanjšano sintezo razvejenih MK ter s spreminjanjem *cis* nenasičenih MK v *trans* obliko s procesom *cis-trans* izomerizacije (Russell, 1984; Sinensky, 1974; Weber in de Bont, 1996). *Trans* MK so po strukturi acilne verige podobne nasičenim MK (Slika 3) in se zato tudi podobno obnašajo, torej zmanjšajo fluidnost (Slika 5). *Cis* MK so se, tako kot razvejane MK in MK s krajšimi acilnimi verigami, zaradi svoje strukture sposobne v celični membrani bolje premikati in tako omogočajo, da je celična membrana bolj fluidna kar omogoči celici boljši sprejem snovi iz okolja (Christie, 2003; Isken in de Bont, 1998).

Ob dodatku PH se pojavijo razvejane MK (Slika 18), ob dodatku mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃ pa se zmanjša delež *trans* MK (C16:1 t9 in C18:1 t11) in sočasno poveča delež *cis* MK (C16:1 c9 in C18:1 c11) ter posledično se zmanjša razmerje *trans/cis* MK (Slike 31, 42 in 43). Te spremembe kažejo, da celica na prisotnost PH oz. mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃ odgovori s povečanjem fluidnosti celične membrane. Razlike v deležih *cis* in *trans* MK ob dodatku mešanic ATR+MET+NH₄NO₃ so odvisne od koncentracije dodanega NH₄NO₃ (Slika 31). Namreč, delež pojavljanja *cis* MK z nižanjem koncentracije NH₄NO₃ pada, medtem ko delež pojavljanja *trans* MK z nižanjem koncentracije NH₄NO₃ narašča. Posledično temu je v primerih dodatka mešanic ATR+MET+NH₄NO₃ razmerje *trans/cis* MK v primerjavi z negativno kontrolo (NK z DMSO) manjše (Slika 43). Ker smo takšne spremembe opazili ob dodatku NH₄NO₃ (Priloga D) ne pa tudi ob dodatku mešanic ATR+MET (Slike 28, 40 in 41),

lahko sklepamo, da je NH_4NO_3 tisti, ki povzroči spremembe v deležih MK in v razmerju trans/cis MK in tako vpliva na povečanje fluidnosti celične membrane. Isto velja, če primerjamo ATR in mešanice ATR+ NH_4NO_3 (Slike 22, 27 in 31) oz. MET in mešanice MET+ NH_4NO_3 (Slike 23, 27 in 31). NH_4NO_3 ima torej dva vpliva, in sicer: poveča fluidnost celične membrane za boljše sprejemanje snovi iz okolja, v primeru mešanic ATR+MET+ NH_4NO_3 pa tudi omogoči negativno učinkovanje pesticidov na rast kulture.

Na povečanje fluidnosti celične membrane sklepamo tudi ob dodatku PCB v koncentraciji 1000 $\mu\text{g/L}$, in sicer zaradi rahlega povečanja razmerja nenasičene/nasičene MK (Slika 39).

Vpliv dodatka PH na profil MK pri *P. putida* se ne ujema z rezultati drugih raziskav, kjer se je fluidnost celične membrane zmanjšala na račun povečanja razmerja trans/cis MK (Heipieper in sod., 1992; Heipieper in sod., 1995; Neumann in sod., 2004). Iz naših rezultatov vidimo, da se razmerje trans/cis MK ne razlikuje od negativne kontrole (NK) pri nobeni koncentraciji PH (Sliki 32 in 33), vidimo pa pojav razvejanih MK v primeru dodanega PH v koncentracijah 16384 $\mu\text{g/L}$; 1024 $\mu\text{g/L}$ in 64 $\mu\text{g/L}$ (Slika 18), iz česar lahko sklepamo na povečanje fluidnosti celične membrane. Pri tem je potrebno opozoriti na dejstvo, da so v drugih raziskavah uporabili vsaj 10- krat večje koncentracije PH (Heipieper in sod., 1992; Heipieper in sod., 1995; Neumann in sod., 2004). Sklepamo, da se kultura na manjše koncentracije fenola (med katere spadajo vse naše uporabljene koncentracije) prilagodi s povečanjem fluidnosti celične membrane, da lahko bolje izkoristi fenol, medtem ko se pri večjih koncentracijah kultura brani pred strupenim učinkom fenola s povečanjem rigidnosti celične membrane in s tem prepreči vdor fenola v celico.

Po podatkih iz drugih raziskav (Ramos in sod., 1997; Kaur in sod., 2005; Grogan in Cronan, 1997) je povečanje fluidnosti mogoče tudi s sintezo MK s ciklopropanskim obročem iz cis nenasičenih MK. Iz naše raziskave to ni razvidno. Možen razlog za to je, da HCl, ki jo uporabljamo pri transesterifikaciji za pripravo FAME, povzroči odprtje ciklopropanskega obroča (Grogan in Cronan, 1997).

Na drugi strani, zaradi povečanja deleža *trans* MK (C16:1 t9 in C18:1 t11) in sočasnega zmanjšanja *cis* MK (C16:1 c9 in C18:1 c11) ter posledično povečanja razmerja trans/cis MK,

sklepamo na zmanjšanje fluidnosti celične membrane. To vidimo iz profilov MK ob dodatku strupenih spojin: HCB, PCB in FL (Slike 24, 25, 26, 27, 36, 37, 38 in 39). Pri HCB vidimo, da je profil MK pri *P. putida* ob dodatku HCB v koncentraciji 0,01 µg/L podoben profilu MK pri negativni kontroli *P. putida* (NK), pri dodatku HCB v koncentracijah večjih od 0,01 µg/L pa statistično značilno odstopa od profila MK pri negativni kontroli *P. putida* (NK) (Slika 24). Razlike so opazne v deležih *cis* in *trans* MK in posledično v razmerjih *trans/cis* MK. Razmerja *trans/cis* MK so podobna v primerih dodanega HCB v koncentracijah večjih od 0,01 µg/L in se razlikujejo od razmerij *trans/cis* MK v primeru dodanega HCB v koncentracijah manjših od 0,01 µg/L in negativne kontrole (NK z DMSO) (Slika 36). Ob dodatku FL v koncentraciji 2000 µg/L sklepamo na zmanjšanje fluidnosti celične membrane zaradi rahlega zmanjšanja razmerja nenasičene/nasičene MK (Slika 39). Le-to se ob dodatku ostalih izbranih strupenih spojin (razen pri PCB1, kar je že opisano zgoraj) in njihovih mešanic ne razlikuje od negativne kontrole (Slike 33, 35, 37, 39, 41 in 43).

Ob dodatku FA, Hg, ATR, MET in mešanic ATR+MET v profilu MK ni opaznih sprememb v deležu posameznih MK kot tudi ne v razmerjih *trans/cis* MK in nenasičene/nasičene MK v primerjavi z ustrezno negativno kontrolo (Slike 16, 17, 20-23, 27, 28, 32-41).

Težke kovin (Cu, Mn, Cd, Cr, Co, Ni) vplivajo na sestavo celične membrane preko membranskih proteinov in ne preko membranskih lipidov (Heipieper, 1996). Za Hg lahko trdimo, da ne deluje na nivoju membranskih lipidov (vsaj ne v območju naših izbranih koncentracij), saj se tako profili MK kot tudi razmerja *trans/cis* MK in nenasičene/nasičene MK ne razlikujejo od negativne kontrole (NK).

Izomerizacijo dvojne vezi iz *cis* v *trans* so do sedaj dokazali le v rodovih *Pseudomonas* in *Vibrio* (Heipieper in sod., 2003). Mi smo z našo raziskavo dokazali, da se profil MK spremeni v smislu spremembe deleža *cis* in *trans* MK kar povzroči spremembe v razmerjih *trans/cis* MK. Iz tega lahko sklepamo, da proces *cis-trans* izomerizacije teče tudi pri *Pseudomonas putida* DSM 50026. Proces teče v smeri nastanka *trans* MK iz *cis* MK, v obratni smeri proces ne teče, saj bi potreboval dodatno energijo (Heipieper in sod., 2003).

Z našo raziskavo smo hoteli preizkusiti pogoje za razvoj alternativnega biotesta, s katerim bi lahko sledili prisotnost strupenih spojin v okolju. Dokazali smo, da se profil MK pri *P. putida* ob dodatku strupenih spojin, v koncentracijah, ki so zakonsko določeno dovoljene v okolju, spremeni v primeru dodanih strupenih spojin: HCB, PCB in FL. Ob dodatku FA, Hg, ATR in MET v koncentracijah, ki so zakonsko določeno dovoljene v okolju, se profil MK pri *P. putida* ne spremeni. V primeru PH lahko govorimo kot o okoljskem onesnaževalu in strupeni spojini, a ne v povezavi s kulturo *P. putida*, saj smo ugotovili, da dodatek PH v koncentracijah uporabljenih v naši raziskavi, dodatno stimulira rast kulture, zaradi česar PH ni stresni dejavnik za kulturo *P. putida*. Tako lahko zaključimo, da *P. putida* ni ustrezen modelni organizem za ugotavljanje sprememb v profilu celičnih MK ob prisotnosti PH v okolju.

Pri interpretaciji dobljenih rezultatov moramo poudariti, da je bila raziskava preliminarna in da zaradi majhnega števila ponovitev ni možno podati statistično trdno podprtih zaključkov. Tako zaključki, ki smo jih postavili ob dobljenih rezultatih, temeljijo na predpostavki, da niso bili posledica naključja, temveč bi se ponovili tudi v primeru večjega števila ponovitev poskusov.

Na podlagi raziskave lahko podamo naslednje sklepe:

- Dodatek fenola v koncentracijah večjih od 190 µg/L sprva deluje na rast kulture *P. putida* zaviralno, vendar sklepamo, da se čez čas kultura prilagodi na dodane količine fenola, saj se rast poveča. Iz danih rezultatov sklepamo, da fenol v koncentracijah, ki smo jih uporabili v naši raziskavi ni strupena spojina za bakterijo *P. putida*.
- PCB in mešanice ATR+MET+NH₄NO₃ povzročijo zmanjšanje rasti kulture *P. putida*.
- Sklepamo, da kultura *P. putida* odgovori na prisotnost PH, NH₄NO₃ ter mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃ s povečanjem fluidnosti celične membrane, kar se pokaže kot pojavljanje razvejanih MK (PH) oz. kot zmanjšanje razmerja trans/cis MK (NH₄NO₃ in mešanice). NH₄NO₃ omogoči negativno učinkovanje mešanice pesticidov na rast kulture *P. putida*.
- Ob dodatku HCB, PCB in FL sklepamo, da se fluidnost celične membrane zmanjša, saj se razmerje trans/cis MK poveča. V primeru dodanega FL1 se rahlo zmanjša tudi razmerje nenasičene/nasičene MK, kar prav tako kaže na zmanjšanje fluidnosti celične membrane.
- FA, Hg, ATR, MET in mešanice ATR+MET ne povzročijo sprememb v profilu MK pri *P. putida*.
- Proces cis-trans izomerizacije teče tudi pri *Pseudomonas putida* DSM 50026.
- Za statistično podprte dokaze o vplivu izbranih strupenih spojin v izbranih koncentracijah na profil MK pri *P. putida* bi bilo potrebno narediti večje število ponovitev posameznih koncentracij izbranih spojin, prav tako bi bilo potrebno testirati izbrane strupene spojine v večjem koncentracijskem območju.

6 POVZETEK

Z ugotavljanjem negativnih vplivov raznih onesnaževal na okolje in posameznika v njem se ukvarja ekotoksikologija. Za sledenje onesnaževal v okolju uporabljamo poleg kemijskih metod tudi razne biološke teste, s katerimi ugotavljamo (negativne) biološke vplive onesnaževal na organizme. Biološke teste razvrščamo po vrstah organizmov ali po biokemičnih odgovorih. Biokemični odgovori vključujejo med drugim tudi spremembe v lipidih. Le-te se pri bakterijah kažejo tudi kot spreminjanje vrste MK, ki vključuje spreminjanje *cis* MK v *trans* obliko s procesom *cis-trans* izomerizacije, spremembe tipa razvejanih MK, spremembe dolžin acilnih verig... *Cis-trans* izomerizacija poteka brez potrebe po energiji in ga vodi encim *cis-trans*-izomeraza (CTI).

V raziskavi smo uporabili metodo priprave metilnih estrov maščobnih kislin (FAME) in transesterifikacijo s kislim katalizatorjem ter detekcijo FAME s plinsko kromatografijo na nepolarni koloni. Analizirali smo profile maščobnih kislin bakterije *P. putida* v prisotnosti različnih koncentracij izbranih strupenih spojin: formaldehid (FA), fenol (PH), živo srebro (Hg), atrazin (ATR), metolaklor (MET), heksaklorbenzen (HCB), pentaklorbifenil (PCB) in fluoranten (FL) ter mešanic: ATR+MET, ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃. Hkrati smo spremljali rast bakterijske kulture z merjenjem optične gostote. Rast kulture *P. putida* se je v primeru dodanega PH povečala, ob dodatku PCB v koncentraciji 1000 µg/L in mešanic ATR+MET+NH₄NO₃ pa zmanjšala. Ob dodatku ostalih izbranih strupenih spojin se rast kulture v primerjavi z negativno kontrolo ni spremenila.

Z zmanjšanjem fluidnosti celične membrane se celica brani pred vdorom strupenih spojin vanjo, medtem ko si s povečanjem fluidnosti celica zagotovi boljše sprejemanje snovi iz okolja. Pojavljanje razvejanih MK v profilu MK pri *P. putida* ob dodatku PH in zmanjšanje razmerja *trans/cis* MK ob dodatku mešanic ATR+NH₄NO₃, MET+NH₄NO₃ in ATR+MET+NH₄NO₃, kaže na povečanje fluidnosti celične membrane. Ker smo zmanjšanje razmerja *trans/cis* MK opazili še ob dodatku NH₄NO₃, ne pa tudi ob dodatku ATR, MET in

mešanice ATR+MET, lahko sklepamo, da je NH_4NO_3 tisti, ki ob prisotnosti mešanic ATR+ NH_4NO_3 , MET+ NH_4NO_3 in ATR+MET+ NH_4NO_3 , povzroči povečanje fluidnosti celične membrane. Na drugi strani povečanje razmerja trans/cis MK pomeni zmanjšanje fluidnosti celične membrane, kar vidimo iz profilov MK ob dodatku strupenih spojin: HCB, PCB in FL. Pri FL v koncentraciji 2000 $\mu\text{g/L}$ se zmanjšanje fluidnosti opazi tudi kot zmanjšanje razmerja nenasičene/nasičene MK. Ob dodatku FA, Hg, ATR, MET in mešanic ATR+MET v profilu MK pri *P. putida* ni opaznih sprememb v deležu posameznih MK kot tudi ne v razmerjih trans/cis MK in nenasičene/nasičene MK. Iz sprememb v razmerju trans/cis MK lahko sklepamo, da proces cis-trans izomerizacije poteka tudi pri *P. putida* DSM 50026.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko zaključimo, da smo uspešno preizkusili osnovne pogoje za uporabo sprememb profila celičnih MK v biotestnem sistemu z bakterijo *Pseudomonas putida*. Potrdili smo, da je tak biotestni sistem dovolj občutljiv za dokazovanje prisotnosti in vplivov HCB, PCB in FL v okolju, ne odziva pa se na prisotnost FA, Hg, ATR in MET. PH v koncentracijah, ki smo jih uporabili v naši raziskavi za *P. putida* ni stresni dejavnik, zato lahko rečemo, da *P. putida* ni ustrezen modelni organizem za prikaz sprememb v profilu celičnih MK ob prisotnosti PH v okolju.

7 VIRI

Australian Government. 2007. Formaldehyde (methyl aldehyde). V: Database National Pollutant Inventory. Canberra, Australian Government, Department of Environment and Water Resources. (april 2007) <http://www.npi.gov.au/database/substance-info/profiles/45.html> (julij 2007): 4 str.

Baltic University Environmental Science. 2006. The damaged environment. Uppsala, Uppsala University. (marec 2006) http://www.balticuniv.uu.se/environmentalscience/ch15/chapter15_g.htm (avgust 2007): 2 str.

Bednaršek N. 2005. Izbira metode za določitev toksičnega vpliva fototransformiranih presnovkov fluorantena na testno bakterijo *Pseudomonas putida*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 52 str.

Christie W.W. 2003. Lipid analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. 3rd ed. Bridgwater, The Oily Press: 416 str.

Christie W.W. 2007. The lipid library. Dundee, Scottish Crop Research Institute (avgust 2007) <http://www.lipidlibrary.co.uk/> (avgust, 2007): 7 str.

Connell D.W., Miller G.J. 1984. Chemistry and ecotoxicology of pollution. New York, John Wiley & Sons: 444 str.

De Souza M.L., Seffernick J., Martinez B., Sadowsky M.J., Wackett L.P. 1998. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*, 180, 7: 1951-1954

Dionisi F., Golay P.-A., Elli M., Fay L.B. 1999. Stability of cyclopropane and conjugated linoleic acids during fatty acid quantification in lactic acid bacteria. *Lipids*, 34, 10: 1107-1115

DSMZ. 1998. German collection of microorganisms and cell cultures. Braunschweig, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (12. Mai 1998) <http://www.dsmz.de/bactnom/nam2400.htm> (avgust 2004): 4 str.

Ehrlich H.L. 2002. Geomicrobiology. 4th ed. New York, Marcel Dekker: 768 str.

European Commission. 2006. Phenol: Summary risk assessment report. Ispra, Institute for Health and Consumer Protection European Chemicals Bureau: 58 str.

Evropska komisija. 2006. Predlog Direktiva Evropskega parlamenta in sveta o okoljskih standardih kakovosti na področju vodne politike in spremembi Direktive 2000/60/ES COM(2006) 398 konč SEC (2006) 947. Bruselj, Komisija evropskih skupnosti. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/sl/com/2006/com2006_0397sl01.pdf (avgust 2007): 24 str.

Farre M., Brix R., Barcelo D. 2005. Screening water for pollutants using biological techniques under European Union Funding during the last 10 years. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 6: 532-545

Forbes V.E., Forbes T.L. 1994. Ecotoxicology in theory and practice. 1st ed. London, Chapman & Hall: 247 str.

Fouchard S., Abdellaoui-Maane Z., Boulanger A., Llopiz P., Neunlist S. 2005. Influence of growth conditions on *Pseudomonas fluorescens* strains: A link between metabolite production and the PLFA profile. *FEMS Microbiology Letters*, 251: 211-218

Grogan D.W., Cronan J.E.Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 4: 429-441

Haack S.K., Garchow H. Odelson D.A. 1994. Accuracy, reproducibility and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 7: 2483-2493

Hartung T., Bremer S., Casati S., Coecke S., Corvi R., Fortaner S., Gribaldo L., Halder M., Janusch Roi A., Prieto P., Sabbioni E., Worth A., Zuang V. 2003. ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: Consequences of the European Union chemicals and cosmetics policies. *Alternatives to Laboratory Animals*, 31: 473-481

Hazel J.R., Williams E.E. 1990. The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research*, 29: 167-227

Heipieper H.J., de Bont J.A.M. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at the level of fatty acid composition of membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 12: 4440-4444

Heipieper H.J., Diefenbach R., Keweloh H. 1992. Conversion of *cis* unsaturated fatty acid to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 6: 1847-1852

Heipieper H.J., Loffeld B., Koweloh H., de Bont J.A.M. 1995. The *cis/trans* isomerisation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12: An indicator for environmental stress due to organic compounds. *Chemosphere*, 30, 6: 1041-1051

Heipieper H.J., Meinhardt F., Segura A. 2003. The *cis-trans* isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanisms. FEMS Microbiology Letters, 229: 1-7

Heipieper H.J., Meulenbeld G., van Oirschot Q., de Bont J.A.M. 1996. Effect of environmental factors on the *trans/cis* ratio of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* S12. Applied and Environmental Microbiology, 62, 8: 2773-2777

Ingram L.O. 1976. Adaptation of membrane lipids to alcohols. Journal of Bacteriology, 125, 2: 670-678

Isken S., de Bont J.A.M. 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. Extremophiles, 2: 229-238

Juang R.-S., Tsai S.-Y. 2006. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate. Biochemical Engineering Journal, 31: 133-140

Junker F., Ramos J.L. 1999. Involvement of the *cis/trans* isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E. Journal of Bacteriology, 181, 18: 5693-5700

Kaur Amrit, Chaudhary A., Kaur Amarjeet, Choudhary R., Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid- A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. Current Science, 89, 7: 1103-1112

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. 1. izd. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 109-125

Lah A. 1998. Voda- vodovje. Poglavitni življenjski vir narave in gospodarstva. Ljubljana, Svet za varstvo okolja Republike Slovenije: 65 str.

Leskošek M. 1993. Gnojenje: Za velik in kakovosten pridelek, za izboljšanje rodovitnosti tal, za varovanje narave. Ljubljana, Kmečki glas: 197 str.

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. New Jersey, Prentice Hall: 1019 str.

Marinšek Logar R. 2007. Metode sledenja dogajanja v vodi. V: Voda. Raspor P. (ur.), Kuščer E. (sour.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 71-84

Marinšek Logar R., Gasparič A., Zorec M., Nekrep F.V. 1997. Praktikum iz morfologije mikroorganizmov. 2. izd. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 68 str.

Marrakchi H., Zhang Y.-M., Rock C.O. 2002. Mechanistic diversity and regulation of type II fatty acid synthesis. Biochemical Society Transactions, 30, 6: 1050-1055

Mjøs S.A. 2003. Identification of fatty acids in gas chromatography by application of different temperature and pressure programs on a single capillary column. Journal of Chromatography A, 1015: 1515-161

Neumann G., Teras R., Monson L., Kivisaar M., Schauer F., Heipieper H.J. 2004. Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: Effects of toxicity and adaptation. Applied and Environmental Microbiology, 70, 4: 1907-1912

Osipov G. A. 2004. Microbial diagnostics. Moscow, Russian Academy of Medical Science (<http://www.rusmedserv.com/microbdiag/eng/>) (avgust 2007): 2 str.

Ramos J.L., Duque E., Rodrigues-Herva J.-J., Godoy P., Haidour A., Reyes F., Fernandez-Barrero A. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 7: 3887-3890

Rand G.M. 1995. *Fundamentals of aquatic toxicology*. 2nd ed. Bristol, Taylor and Francis: 1148 str.

Ritter L., Solomon K.R., Forget J., Stemeroff M., O'Leary C. 1995. A review of selected persistent organic pollutants. DDT-aldrin-dieldrin-endrin-chlordane, heptachlor-hexachlorobenzene-mirex-toxaphene, polychlorinated biphenyls, dioxins and furans. Guelph, World Health Organization: 149 str.

Russell N.J. 1984. Mechanism of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends in Biochemical Sciences*, 9: 108-112

Spector A.A., Yorek M.A. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*, 26: 1015-1035

Stead D.E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42, 2: 281-295

Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation- A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 2: 522-525

Ternifi V.(ur.) 1998. *Priročnik o toksikoloških lastnostih pesticidov v Republiki Sloveniji*. 1.izdaja. Ljubljana, Ministrstvo za zdravstvo Republike Slovenije: 683 str.

Uredba o kemijskem stanju površinskih voda. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 11: 818-822

U.S. Department of Health and Human Services. 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. Atlanta, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: 487 str.

Von Wallbrunn A., Richnow H.H., Neumann G., Meinhardt F., Heipieper H.J. 2003. Mechanism of *cis-trans* isomerization of unsaturated fatty acid in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 185, 5: 1730-1733

Wayne Moss C., Samuels S.B., Weaver R.E. 1972. Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology*, 24, 4: 596-598

Weber F.J., de Bont J.A.M. 1996. Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286: 225-245

WHO. 2003a. Atrazine in drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization: 10 str.

WHO. 2003b. Polychlorinated biphenyls: Human health aspects. Geneva, World Health Organization: 64 str.

WHO. 2006. Guidelines for drinking-water quality. 1st addendum to 3rd ed. Recommendations: Vol.1, Geneva: 595 str. (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq0506.pdf) (avgust 2007)

Zorec M. 2006. Kemotaksonomska analiza dolgoveržnih maščobnih kislin in maščobnih aldehydov v vampnih bakterijah iz rodov *Butyrivibrio* in *Pseudobutyrvibrio*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 126 str.

ZAHVALA

Za usmerjanje tekom praktičnega dela, za vso pomoč ob pisanju diplome, za vse spodbudne besede, predvsem pa za to, da sem lahko поблиžje spoznala delo ekotoksikologije, se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar.

Za odgovore na vsa moja vprašanja, za vso tehnično pomoč in za vse vesele trenutke se zahvaljujem vsem zaposlenim na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnobiotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete v Domžalah.

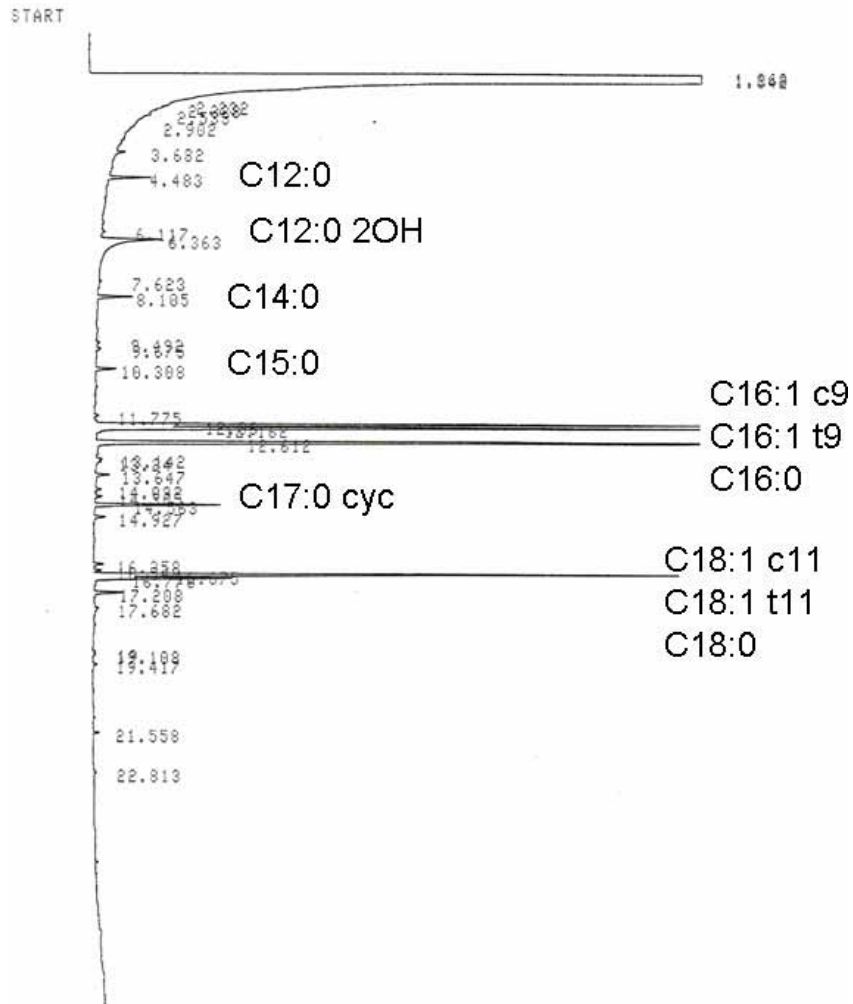
Za mirjenje živcev in tako moralno kot fizično pomoč pri raziskovalnem delu- Maša in Nataša hvala vama!

Hvala recenzentu prof. dr. Davidu Stoparju za hiter pregled diplomske naloge in doc. dr. Špeli Malovrh za svetovanje pri statistični obdelavi rezultatov.

Za dvigovanje osebne morale se zahvaljujem mami Mariji, sestri Katji, atiju Alojzu, stari mami Rozi in ostalim sorodnikom, ki mi pomagata premagati marsikatero oviro. Hvala, ker verjamete vame!

Posebna zahvala gre tudi vsem prijateljem, ki mi stojite ob strani, ko vas potrebujem, ki se veselite z mano, ko gre vse po načrtih in ki me vzpodbujate, ko izgubim tla pod nogami.

Iskrena hvala vsem, ki ste kakorkoli pripomogli k moji osebni rasti in mi dali moči in volje za hojo po svoji poti!



Priloga A2: Kromatogram vzorca HCB3

Priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistematskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

sistematsko ime MKA; trivialno ime	okrajšava MKA	faktorji ECL
nonanojska kislina; pelargonska kislina	C9:0	9,00
nonal	DMA C9:0	9,55
8-metil-nonanojska ali izo-dekanojska kislina	i-C10:0	9,66
dekanojska kislina; kaprična kislina	C10:0	10,00
3-hidroksi-nonanojska kislina	C9:0 3OH	10,43
dekanal	DMA C10:0	10,55
9-metil-dekanojska ali izo-undekanojska kislina	i-C11:0	10,66
8-metil-dekanojska ali anteizo-undekanojska kislina	a-C11:0	10,74
cis-10-undecenojska kislina	C11:1 c10	10,89
undekanojska kislina	C11:0	11,00
2-hidroksi-dekanojska kislina	C10:0 2OH	11,15
9-metil-dekanal, izo-undekanal	DMA i-C11:0	11,21
8-metil-dekanal, anteizo-undekanal	DMA a-C11:0	11,29
3-hidroksi-dekanojska kislina	C10:0 3OH	11,45
undekanal	DMA C11:0	11,55
10-metil-undekanojska ali izo-dodekanojska kislina	i-C12:0	11,66
9-metil-undekanojska ali anteizo-dodekanojska kislina	a-C12:0	11,74
cis-11-dodecenojska kislina	C12:1 c11	11,92
dodekanojska kislina; lavrinska kislina	C12:0	12,00
3-hidroksi-9-metil-dekanojska kislina	i-C11:0 3OH	-
2-hidroksi-undekanojska kislina	C11:0 2OH	12,16
10-metil-undekanal, izo-dodekanal	DMA i-C12:0	12,21
9-metil-undekanal, anteizo dodekanal	DMA a-C12:0	12,29
3-hidroksi-undekanojska kislina	C11:0 3OH	12,47
dodekanal	DMA C12:0	12,55
11-metil-dodekanojska ali izo-tridekanojska kislina	i-C13:0	12,66
10-metil-dodekanojska ali anteizo-tridekanojska kislina	a-C13:0	12,74
cis-12-tridecenojska kislina	C13:1 c12	12,92
tridekanojska kislina	C13:0	13,00
3-hidroksi-10-metil-undekanojska kislina	i-C12:0 3OH	-
2-hidroksi-dodekanojska kislina	C12:0 2OH	13,17
11-metil-dodekanal, izo-tridekanal	DMA i-C13:0	13,21
10-metil-dodekanal, anteizo-tridekanal	DMA a-C13:0	13,29
3-hidroksi-dodecenojska kislina	C12:1 3OH	-
12-metil-tridecenojska kislina izomer E	i-C14:1 E	-
3-hidroksi-dodekanojska kislina	C12:0 3OH	13,49
tridekanal	DMA C13:0	13,55
12-metil-tridekanojska ali izo-tetradekanojska kislina	i-C14:0	13,66
11-metil-tridekanojska ali anteizo-tetradekanojska kislina	a-C14:0	13,74
tetradecenojska kislina izomer X (cis-7?)	C14:1 X	13,80
2-hidroksi-11-metil-dodekanojska kislina	i-C13:0 2OH	-
cis-9-tetradecenojska kislina; miristoleinska kislina	C14:1 c9	13,88
tetradecenojska kislina izomer Y	C14:1 Y	13,91
tetradekanojska kislina; miristinska kislina	C14:0	14,00

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistematskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

sistematsko ime MKA; trivialno ime	okrajšava MKA	faktorji ECL
3-hidroksi-11-metil-dodekanojska kislina	i-C13:0 3OH	-
2-hidroksi-tridekanojska kislina	C13:0 2OH	14,19
12-metil-tridekanal, izo-tetradekanal	DMA i-C14:0	14,20
3-hidroksi-10-metil-dodekanojska kislina	a-C13:0 3OH	-
11-metil-tridekanal, anteizo-tetradekanal	DMA a-C14:0	14,28
tetradecenal izomer X (cis-7?)	DMA C14:1 X	14,34
14-metil-tetradecenojska kislina izomer E	i-C15:1 E	-
14-metil-tetradecenojska kislina izomer F	i-C15:1 F	-
tetradecenal izomer Y	DMA C14:1 Y	14,45
14-metil-tetradecenojska kislina izomer G	i-C15:1 G	-
14-metil-tetradecenojska kislina izomera H in I	i-C15:1 H/I	-
3-hidroksi-tridekanojska kislina	C13:0 3OH	14,50
12-metil-tetradecenojska kislina izomer A	a-C15:1 A	-
tetradekanal	DMA C14:0	14,54
13-metil-tetradekanojska ali izo-pentadekanojska kislina	i-C15:0	14,66
12-metil-tetradekanojska ali anteizo-pentadekanojska kislina	a-C15:0	14,74
pentadecenojska kislina izomer X (cis-6?)	C15:1 X	-
pentadecenojska kislina izomer A	C15:1 A	-
pentadecenojska kislina izomer B	C15:1 B	-
cis-10-pentadecenojska kislina	C15:1 c10	14,88
pentadecenojska kislina izomer Y	C15:1 Y	14,91
pentadekanojska kislina	C15:0	15,00
3-hidroksi-12-metil-tridekanojska kislina	i-C14:0 3OH	-
13-metil-tetradekanal, izo-pentadekanal	DMA i-C15:0	15,20
2-hidroksi-tetradekanojska kislina	C14:0 2OH	15,21
12-metil-tetradekanal, anteizo-pentadekanal	DMA a-C15:0	15,28
pentadecenal izomer X (cis-6?)	DMA C15:1 X	-
pentadecenal izomer Y	DMA C15:1 Y	15,45
14-metil-pentadecenojska kislina izomer F	i-C16:1 F	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer G	i-C16:1 G	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer H	i-C16:1 H	-
14-metil-pentadecenojska kislina izomer I	i-C16:1 I	-
3-hidroksi-tetradekanojska kislina	C14:0 3OH	15,52
pentadekanal	DMA C15:0	15,54
14-metil-pentadekanojska kislina; izo-palmitinska kislina	i-C16:0	15,66
13-metil-pentadekanojska kislina; anteizo-palmitinska kislina	a-C16:0	15,74
cis-5-heksadecenojska kislina	C16:1 c5	-
cis-7-heksadecenojska kislina	C16:1 c7	15,74
cis-9-heksadecenojska kislina; palmitoleinska kislina	C16:1 c9	15,79
trans-9-heksadecenojska kislina; palmitelaidinska kislina	C16:1 t9	15,84
2-hidroksi-13-metil-tetradekanojska kislina	i-C15:0 2OH	-
heksadecenojska kislina izomer C (cis-11?)	C16:1 C	15,87
heksadekanojska kislina; palmitinska kislina	C16:0	16,00
3-hidroksi-13-metil-tetradekanojska kislina	i-C15:0 3OH	-
14-metil-pentadekanal, izo-heksadekanal	DMA i-C16:0	16,18
2-hidroksi-pentadekanojska kislina	C15:0 2OH	16,22
3-hidroksi-12-metil-tetradekanojska kislina	a-C15:0 3OH	-
13-metil-pentadekanal, anteizo-heksadekanal	DMA a-C16:0	16,26
cis-9-heksadecenal	DMA C16:1 c9	16,31
heksadecenal izomer C (cis-11?)	DMA C16:1 C	16,39
15-metil-cis-6-heksadecenojska kislina	i-C17:1 c6	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer E	i-C17:1 E	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer G	i-C17:1 G	-

se nadaljuje

Nadaljevanje Priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistematskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

sistematsko ime MKA; trivialno ime MK	okrajšava MKA	faktorji ECL
15-metil-heksadecenojska kislina izomer H	i-C17:1 H	-
15-metil-heksadecenojska kislina izomer I	i-C17:1 I	-
14-metil-heksadecenojska kislina izomer B	a-C17:1 B	-
3-hidroksi-pentadecanojska kislina	C15:0 3OH	16,54
heksadekanal	DMA C16:0	16,54
14-metil-heksadecenojska kislina izomer C	a-C17:1 C	-
14-metil-heksadecenojska kislina izomer A	a-C17:1 A	-
15-metil-heksadecenojska ali izo-heptadecenojska kislina	i-C17:0	16,65
14-metil-heksadecenojska ali anteizo-heptadecenojska kislina	a-C17:0	16,73
heptadecenojska kislina izomer A	C17:1 A	-
cis-9-heptadecenojska kislina	C17:1 c9	-
cis-10-heptadecenojska kislina	C17:1 c10	16,79
heptadecenojska kislina izomer C (cis-11?)	C17:1 C	16,83
cis-9,10-metilen-heksadecenojska kislina	C17:0 cyc-9,10	16,86
heptadecenojska kislina izomer X	C17:1 X	16,89
heptadecenojska kislina; margarinska kislina	C17:0	17,00
2-hidroksi-heksadecenojska kislina	C16:1 2OH	-
3-hidroksi-14-metil-pentadecanojska kislina	i-C16:0 3OH	-
15-metil-heksadecanal, izo-heptadecanal	DMA i-C17:0	17,17
2-hidroksi-heksadecenojska kislina	C16:0 2OH	17,24
14-metil-heksadecanal, anteizo-heptadecanal	DMA a-C17:0	17,25
cis-10-heptadecenal	DMA C17:1 c10	17,31
heptadecenal izomer C (cis-11?)	DMA C17:1 C	17,35
16-metil-heptadecenojska kislina izomer G	i-C18:1 G	-
16-metil-heptadecenojska kislina izomer H	i-C18:1 H	-
heptadekanal	DMA C17:0	17,54
3-hidroksi-heksadecenojska kislina	C16:0 3OH	17,56
16-metil-heptadecenojska kislina; izo-stearinska kislina	i-C18:0	17,65
cis-9, cis-12-oktadecadienojska kislina; linolna kislina	C18:2 c9,c12	17,66
15-metil-heptadecenojska ali anteizo-oktadecenojska kislina	a-C18:0	17,73
cis-9-oktadecenojska kislina; oleinska kislina	C18:1 c9	17,73
cis-11-oktadecenojska kislina; cis-vakcenska kislina	C18:1 c11	17,79
trans-9-oktadecenojska kislina; elaidinska kislina	C18:1 t9	17,79
trans-6-oktadecenojska kislina	C18:1 t6	17,79
trans-11-oktadecenojska kislina; vakcenska kislina	C18:1 t11	17,83
oktadecenojska kislina izomer B (cis-13?)	C18:1 B	17,88
oktadecenojska kislina izomer X	C18:1 X	17,91
oktadecenojska kislina; stearinska kislina	C18:0	18,00
3-hidroksi-15-metil-heksadecenojska kislina	i-C17:0 3OH	-
16-metil-heptadecanal, izo-oktadecanal	DMA i-C18:0	18,17
3-hidroksi-14-metil-heksadecenojska kislina	a-C17:0 3OH	-
2-hidroksi-heptadecenojska kislina	C17:0 2OH	18,25
15-metil-heptanal, izo-oktadecanal	DMA a-C18:0	18,25
cis-9-oktadecenal	DMA C18:1 c9	18,25
trans-9-oktadecenal	DMA C18:1 t9	18,31
cis-11-oktadecenal	DMA C18:1 c11	18,31
trans-6-oktadecenal	DMA C18:1 t6	18,31
trans-11-oktadecenal	DMA C18:1 t11	18,35
oktadecenal izomer B (cis-13?)	DMA C18:1 B	18,40
17-metil-oktadecenojska kislina izomer I	i-C19:1 I	-
oktadekanal	DMA C18:0	18,54
3-hidroksi-heptadecenojska kislina	C17:0 3OH	18,57
17-metil-oktadecenojska ali izo-nonadecenojska kislina	i-C19:0	18,65
16-metil-oktadecenojska ali anteizo-nonadecenojska kislina	a-C19:0	18,73

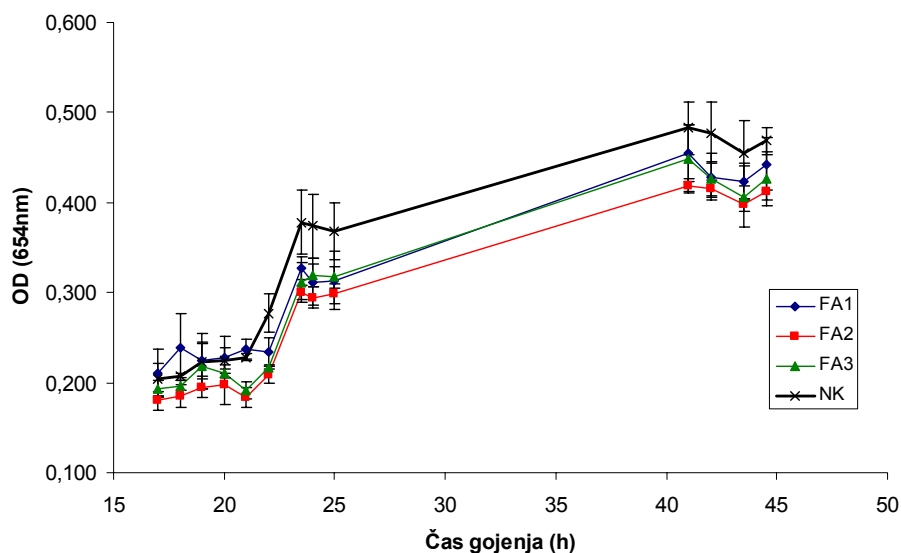
se nadaljuje

Nadaljevanje Priloga B: Seznam maščobnih kislin in maščobnih aldehydov s sistematskim in trivialnim poimenovanjem, okrajšavami ter faktorji ECL (Zorec, 2006)

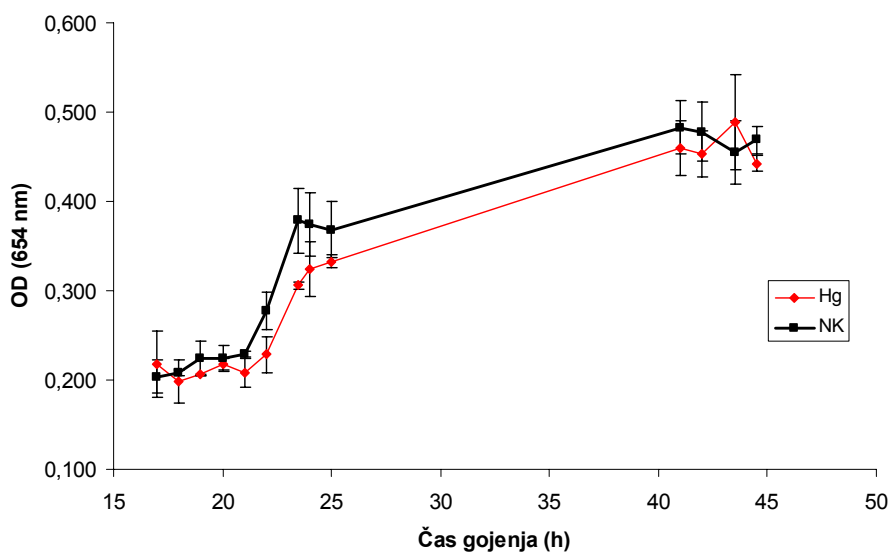
sistematsko ime MKA; trivialno ime MK	okrajšava MKA	faktorji ECL
cis-10-nonadecenojska kislina	C19:1 c10	18,73
nonadecenojska kislina izomer X	C19:1 X	-
trans-7-nonadecenojska kislina	C19:1 t7	-
cis-9,10-metilen-oktadekanojska kislina; dihidrosterulna kislina	C19:0 cyc9,10	18,84
cis-11,12-metilen-oktadekanojska kislina; laktobacilna kislina	C19:0 cyc11,12	18,87
nonadekanojska kislina	C19:0	19,00
2-hidroksi-oktadecenojska kislina	C18:1 2OH	-
3-hidroksi-16-metil-heptadekanojska kislina	i-C18:0 3OH	-
17-metil-oktadekanal, izo-nonadekanal	DMA i-C19:0	19,17
16-metil-oktadekanal, anteizo-nonadekanal	DMA a-C19:0	19,25
2-hidroksi-oktadekanojska kislina	C18:0 2OH	19,27
cis-11,12-metilen-oktadekanal	DMAC19:0 cyc11,12	19,39
nonadekanal	DMA C19:0	19,54
3-hidroksi-oktadekanojska kislina	C18:0 3OH	19,59
18-metil-nonadekanojska kislina; izo-arahidinska kislina	i-C20:0	19,65
cis-9-eikozenojska kislina; gadoleinska kislina	C20:1 c9	-
cis-11-eikozenojska kislina	C20:1 c11	19,73
trans-11-eikozenojska kislina	C20:1 t11	19,79
cis-13-eikozenojska kislina	C20:1 c13	19,79
eikozanojska kislina; arahidinska kislina	C20:0	20,00

V Prilogi B so prikazani ECL faktorji, pridobljeni z delom na koloni Equity-1 (nepolarna stacionarna faza 100 % poli-dimetil-siloksan), s temperaturnim programom od 150 °C do 250 °C s stopnjo naraščanja temperature 4 °C na minuto; krepko so izpisani faktorji ECL izračunani iz retencijskega časa posamezne maščobne kisline in maščobnega aldehyda, normalno izpisani so faktorji ECL izračunani prek faktorjev FCL ali predvideni glede na vrednosti iz literature.

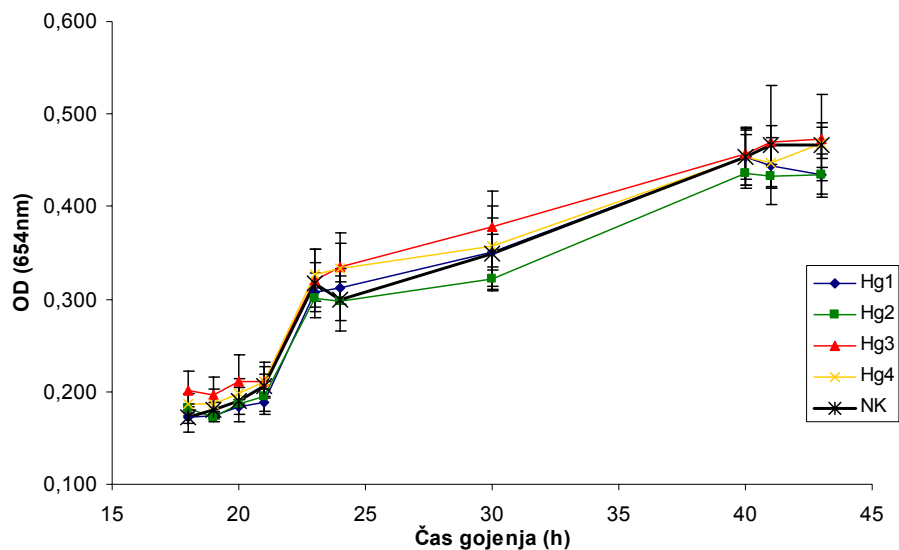
Priloge C: Rast *P. putida* v prisotnosti izbranih strupenih spojin



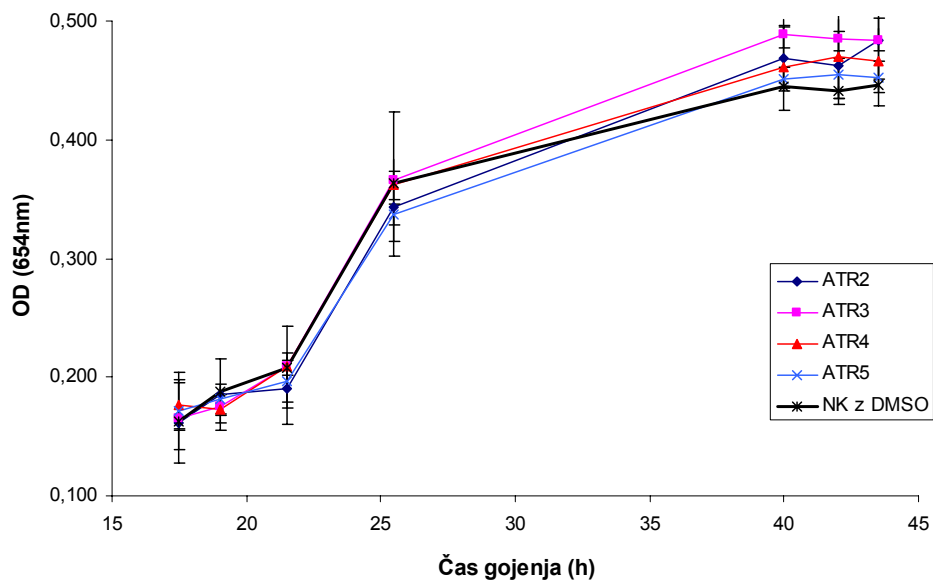
Priloga C41: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku (FA) v koncentracijah FA1= 16384 $\mu\text{g/L}$, FA2= 1024 $\mu\text{g/L}$ in FA3= 64 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



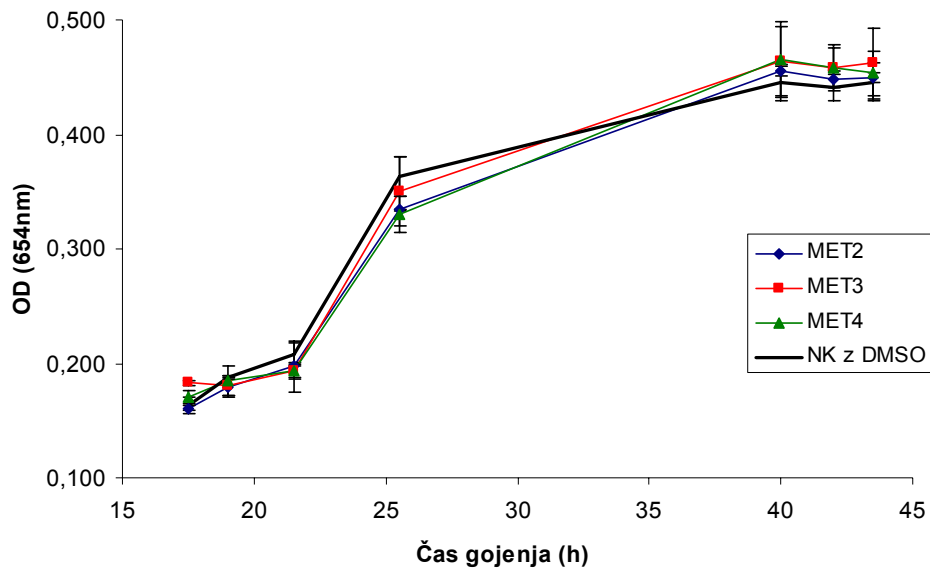
Priloga C42: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku Hg v koncentraciji 200,6 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrolne kulture *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



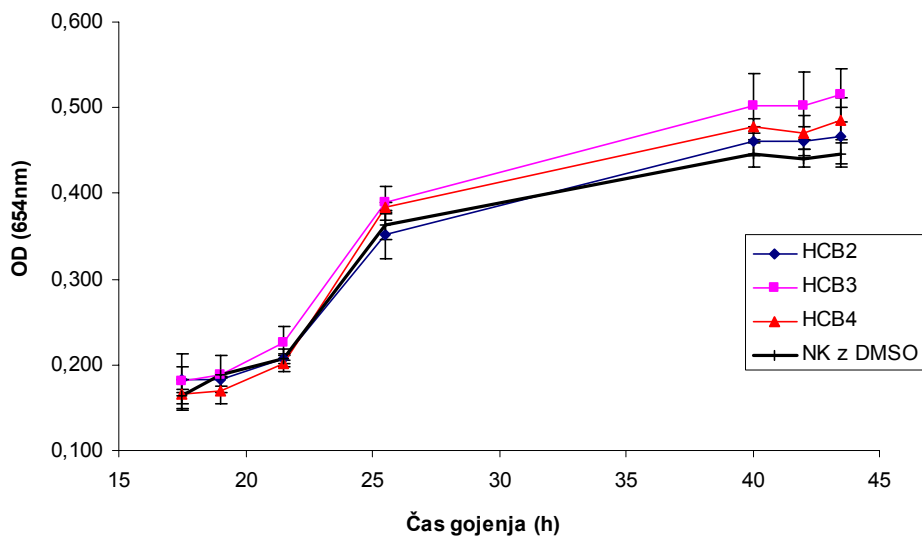
Priloga C43: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku Hg v koncentracijah Hg1= 200, 6 $\mu\text{g/L}$, Hg2= 20,06 $\mu\text{g/L}$, Hg3= 2,006 $\mu\text{g/L}$ in Hg4= 0,2006 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



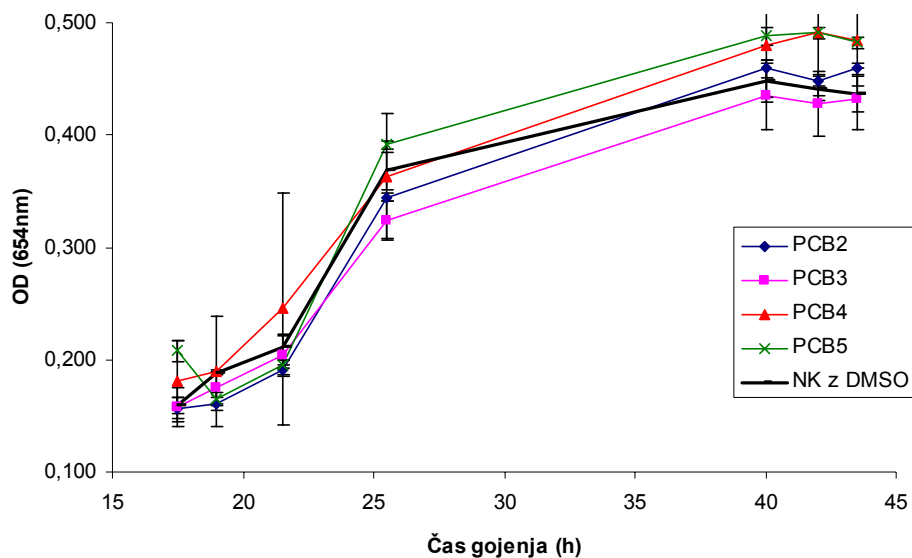
Priloga C44: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku atrazina (ATR) v koncentracijah ATR2= 10 $\mu\text{g/L}$, ATR3= 1 $\mu\text{g/L}$, ATR4= 0,1 $\mu\text{g/L}$ in ATR5= 0,01 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



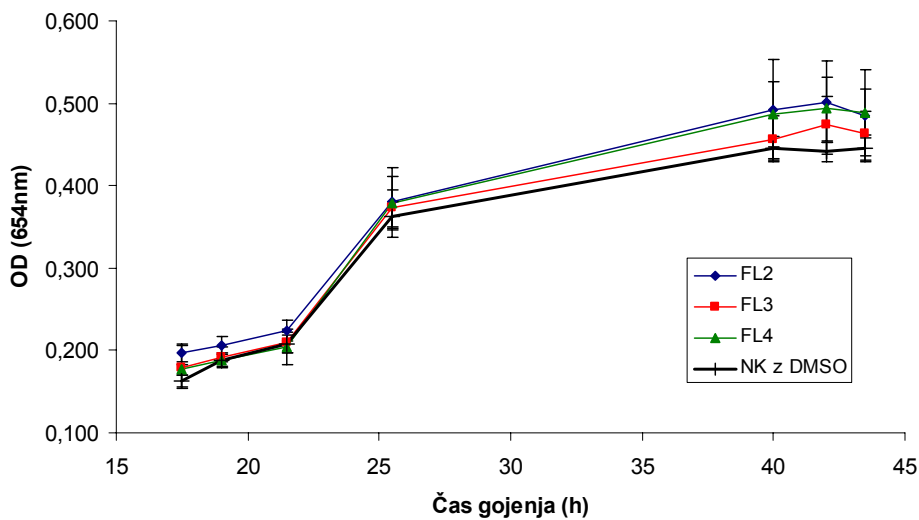
Priloga C45: bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku metolaklora (MET) v koncentracijah MET2= 1 $\mu\text{g/L}$, MET3= 0,1 $\mu\text{g/L}$ in MET4= 0,01 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



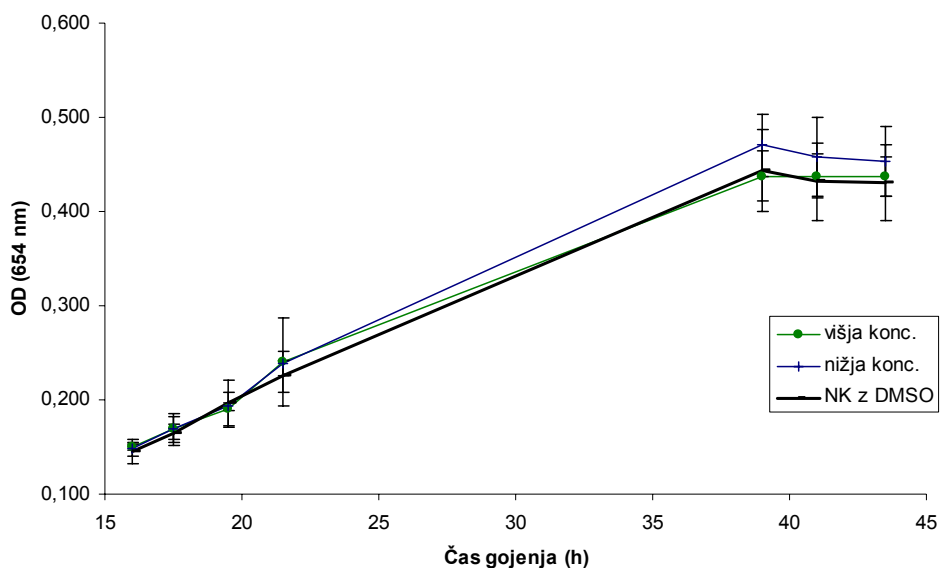
Priloga C46: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku heksaklorbenzena (HCB) v koncentracijah HCB2= 1 $\mu\text{g/L}$, HCB3= 0,1 $\mu\text{g/L}$ in HCB 4= 0,01 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



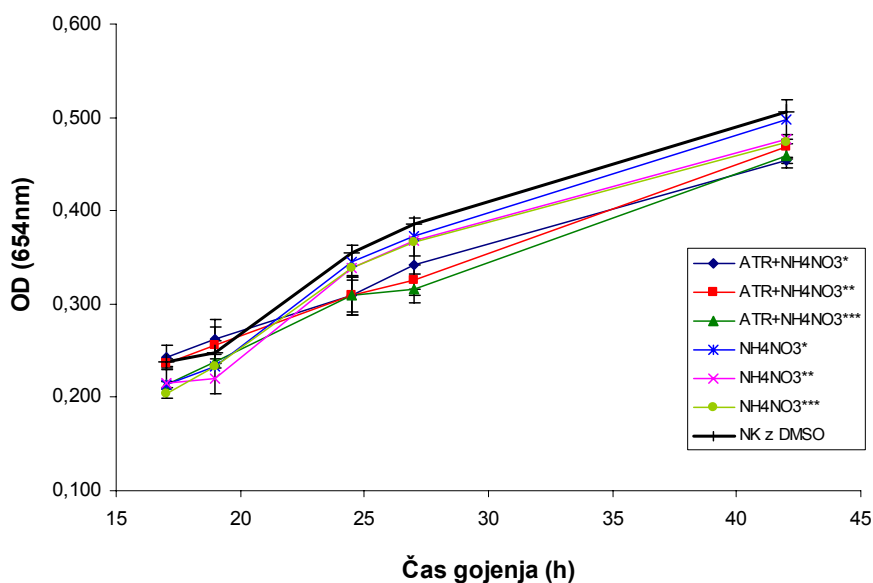
Priloga C47: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku pentaklorbifenila (PCB) v koncentracijah PCB2= 10 $\mu\text{g/L}$, PCB3= 1 $\mu\text{g/L}$, PCB4= 0,1 $\mu\text{g/L}$ in PCB5= 0,01 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



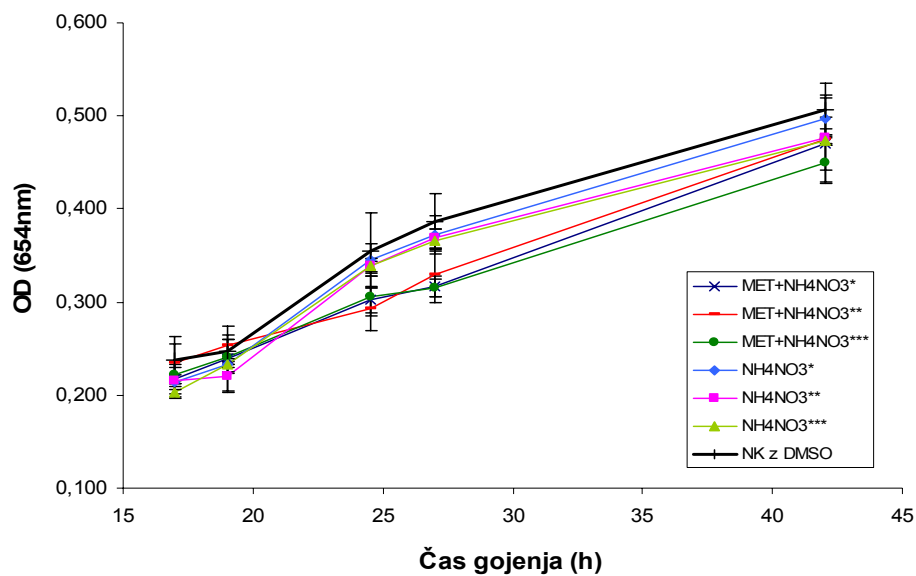
Priloga C48: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku fluorantena (FL) v koncentracijah FL2= 2 $\mu\text{g/L}$, FL3= 0,2 $\mu\text{g/L}$ in FL4= 0,02 $\mu\text{g/L}$ v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



Priloga C49: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku mešanice ATR+MET v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 2 v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

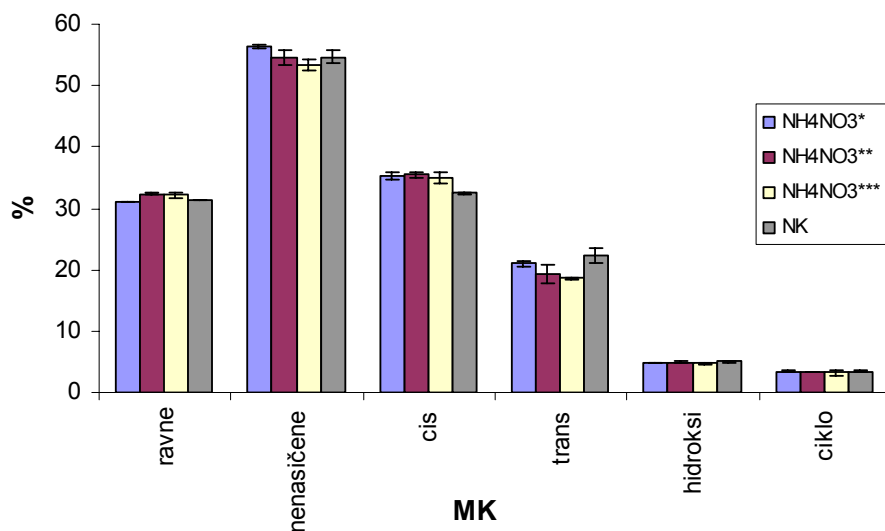


Priloga C50: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku NH_4NO_3 in mešanic ATR+ NH_4NO_3 v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 3 (* pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3=100$ mg/L, ** pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3=50$ mg/L in *** pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3=20$ mg/L) v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).

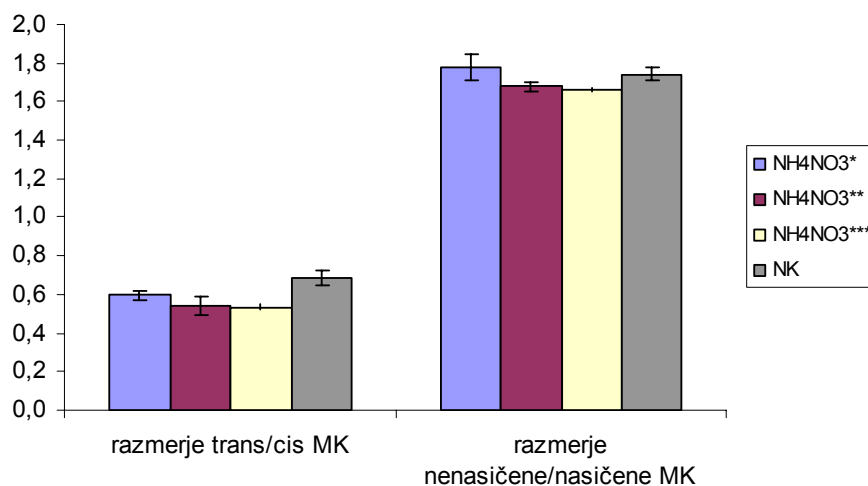


Priloga C51: Rast bakterijske kulture *P. putida* ob dodatku NH_4NO_3 in mešanic MET+ NH_4NO_3 v koncentracijah predstavljenih v Preglednici 3 (* pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3=100$ mg/L, ** pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3=50$ mg/L in *** pomeni koncentracijo $\text{NH}_4\text{NO}_3=20$ mg/L) v primerjavi z rastjo negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni ($n=3$).

Priloga D: Deleži MK ter razmerji trans/cis MK in nenasičene/nasičene MK ob dodatku NH_4NO_3



Priloga D52: Deleži MK pri *P. putida* ob dodatku NH_4NO_3 (koncentracije so prikazane v Preglednici 3) v primerjavi z deleži MK negativne kontrole *P. putida* (NK z DMSO). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).



Priloga D53: Razmerje trans/cis in nenasičene/nasičene MK pri *P. putida* ob dodatku NH_4NO_3 , (koncentracije so prikazane v Preglednici 3) v primerjavi z negativno kontrolo *P. putida* (NK). Rezultati so prikazani kot povprečje \pm standardni odkloni (n=3).