

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša FAJFAR

**VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE KOLOIDOV
NA AKTIVNOST BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Nataša FAJFAR

**VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE KOLOIDOV NA AKTIVNOST
BAKTERIJ**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF COLLOID TYPE AND CONCENTRATION ON
BACTERIAL ACTIVITY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Davida Stoparja in za recenzenta prof. dr. Jadrana Faganelija.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Recenzent: prof. dr. Jadran Faganeli

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Darja ŽGUR-BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Jadran FAGANELI
Nacionalni inštitut za biologijo, Morska biološka postaja Piran

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Nataša Fajfar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.24.083: 544.18 (043) = 863
KG	koloidi/minerali glin/kaolinit/bentonit/gojišča/mikroorganizmi/bakterije/ <i>Pseudoalteromonas</i> /vezava hranil/pritrjanje bakterij/aktivnost bakterij/ respiracija/rast bakterij
AV	FAJFAR, Nataša
SA	STOPAR, David (mentor)/FAGANELI, Jadran (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2006
IN	VPLIV VRSTE IN KONCENTRACIJE KOLOIDOV NA AKTIVNOST BAKTERIJ
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 33 str., 1 pregl., 12 sl., 5 pril., 63 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Koloidi so prisotni v vseh naravnih okoljih in lahko zaradi svoje velike površine in naboja vplivajo na dostopnost in bakterijsko izrabo hranil. V diplomski nalogi smo vzpostavili modelni sistem, ki je vseboval bakterijsko gojišče, različne koloide (bentonit, kaolinit) in bakterijski sev, kjer smo proučevali vpliv koloidov na rast in respiracijo morske bakterije <i>Pseudoalteromonas</i> sp.. Rast smo spremljali spektrofotometrično in nato iz ravnih krivulj matematično določili rastne parametre. Rast seva <i>Pseudoalteromonas</i> sp. je bila v primerjavi s kontrolo slabša v gojiščih, ki smo jih predinkubirali s koloidi. Največji vpliv na rast je imel bentonit. Tu je bila hitrost rasti najmanjša, prav tako je bila manjša nosilnost okolja, in sicer za več kot 70 %. Ugotovili smo, da se hranila vežejo na koloide že po 1 uri. Na bentonit se je vezalo 4-krat več hranil kot na kaolinit, kar je eden izmed možnih vzrokov za slabšo rast na bentonitu. Vpliv koloidov na hitrost respiracije seva <i>Pseudoalteromonas</i> sp. smo spremljali z merjenjem produkcije CO ₂ v 1 uri. Hitrost respiracije je bila ob prisotnih koloidih, predvsem bentonitu, manjša. Z večanjem koncentracije koloidov se je hitrost respiracije zmanjšala.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.24.083: 544.18 (043) = 863
CX	colloids/clay minerals/kaolinite/bentonite/media/microorganisms/bacteria/ <i>Pseudoalteromonas</i> /nutrient adsorption/attachment of bacteria/bacterial activity/respiration/bacterial growth
AU	FAJFAR, Nataša
AA	STOPAR, David (supervisor)/FAGANELI, Jadran (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2006
TI	INFLUENCE OF COLLOID TYPE AND CONCENTRATION ON BACTERIAL ACTIVITY
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 33 p., 1 tab., 12 fig., 5 ann., 63 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Colloids occur in all natural environments and can effect availability and bacterial uptake of nutrients because of their large surface area and charge. In a laboratory model system composed of bacterial growth medium, different colloids (bentonite, kaolinite) and bacterial strain the effect of colloids on growth and respiration of a marine bacterium <i>Pseudoalteromonas</i> sp. was studied. Bacterial growth was measured with spectrophotometer and growth parameters were obtained by fitting the logistic equation to experimentally obtained growth curves. Growth of <i>Pseudoalteromonas</i> sp. was lower in medium incubated with colloids. The growth rate was the lowest in bentonite growth medium and the carrying capacity of the bentonite environment was more than 70 % lower as compared to the control experiments. Nutrients adsorb to colloids in less than 1 hour in both kaolinite and bentonite growth medium. Adsorption of nutrients to bentonite was 4-times higher than adsorption to kaolinite. The effect of colloids on respiration of <i>Pseudoalteromonas</i> sp. was measured by CO ₂ production. Respiration was reduced in the presence of colloids, especially in the presence of bentonite. We also found out, that with increasing concentrations of colloids respiration rate is reduced.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Kazalo prilog	IX
	Okrajšave in simboli	X
1	UVOD	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	SPLOŠNE LASTNOSTI KOLOIDOV	2
2.1.1	Razširjenost koloidov	2
2.1.2	Izvor koloidov	2
2.1.3	Vloga koloidov v vodnih okoljih	3
2.2	MINERALI GLIN	4
2.2.1	Struktura mineralov glin	4
2.3	VEZAVA HRANIL NA KOLOIDE	6
2.4	PRITRJANJE MIKROORGANIZMOV NA DELCE	7
2.5	VPLIVI KOLOIDNIH DELCEV NA BAKTERIJSKO AKTIVNOST	8
2.5.1	Primerjava aktivnosti pritrjenih in nepritrjenih bakterij	8
2.5.2	Primerjava med kaolinitom in montmorillonitom	9
3	MATERIAL IN METODE	11
3.1	MATERIAL	11
3.2	BAKTERIJSKI SEV	12
3.3	EKSPERIMENTALNI SISTEM	12
3.4	HITROST RASTI IN NOSILNOST OKOLJA V GOJIŠČIH S KOLOIDI	12
3.5	HITROST RESPIRACIJE V GOJIŠČIH S KOLOIDI	13
3.5.1	Priprava gojišč s koloidi in bakterijske kulture <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	13

3.5.2	Merjenje produkcije CO₂	13
3.5.3	Določanje količine proizvedenega CO₂	14
3.6	DOLOČANJE VEZAVE HRANIL NA KOLOIDE	14
3.7	DOLOČANJE PRITRJANJA CELIC NA KOLOIDE	15
4	REZULTATI	16
4.1	HITROST RASTI IN NOSILNOST OKOLJA V GOJIŠČIH S KOLOIDI	16
4.2	HITROST RESPIRACIJE V GOJIŠČIH S KOLOIDI	17
4.2.1	Vzpostavitev ravnovesja	17
4.2.2	Vpliv koncentracije koloidov na hitrost respiracije	18
4.2.3	Vpliv časa predinkubacije gojišča s koloidi na hitrost respiracije	19
4.2.4	Vpliv odstranitve koloidov iz gojišč na hitrost respiracije	20
4.3	VEZAVA HRANIL NA RAZLIČNE KOLOIDE	21
4.4	PRITRJANJE CELIC <i>PSEUDOALTEROMONAS</i> SP. NA RAZLIČNE KOLOIDE	22
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	23
5.1	RAZPRAVA	23
5.1.1	Vpliv koloidov na hitrost rasti in nosilnost okolja	23
5.1.2	Vpliv koloidov na hitrost respiracije	23
5.2	SKLEPI	25
6	POVZETEK	26
7	VIRI	27

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Primerjava fizikalno-kemijskih lastnosti med montmorillonitom in kaolinitom (Wenk in Bulakh, 2004; Manahan, 2005).	4
-----------	--	---

KAZALO SLIK

Sl. 1:	(a) Si – tetrahedron in (b) tetrahedralna plast (Grim, 1968).	5
Sl. 2:	(a) Al – oktahedron in (b) oktahedralna plast (Grim, 1968).	5
Sl. 3:	Struktura kaolinita – 1:1 struktura (Grim, 1968).	5
Sl. 4:	Struktura montmorillonita – 2:1 struktura (Grim, 1968).	6
Sl. 5:	Nosilnosti okolja seva <i>Pseudoalteromonas</i> sp. v gojiščih PKS z različnimi koncentracijami peptona in kvasnega ekstrakta.	16
Sl. 6:	Nosilnost okolja in hitrost rasti seva <i>Pseudoalteromonas</i> sp. v različnih gojiščih: Kontrola – gojišče PKS, K – gojišče PKS predinkubirano s kaolinitom, B – gojišče PKS predinkubirano z bentonitom.	17
Sl. 7:	Hitrost raztapljanja CO ₂ v gojišču s koloidi.	18
Sl. 8:	Vpliv različnih koncentracij koloidov (0,008 g/mL oz. 0,04 g/mL) na produkcijo CO ₂ seva <i>Pseudoalteromonas</i> sp..	18
Sl. 9:	Vpliv časa predinkubacije gojišča s koloidi (1 ura, 24 ur) na produkcijo CO ₂ seva <i>Pseudoalteromonas</i> sp..	19
Sl. 10:	Produkcija CO ₂ v gojišču s koloidi in v gojišču, v katerem smo inkubirali koloide in jih nato odstranili.	20
Sl. 11:	Delež vezanih proteinov na različnih koloidih (B – bentonit, K – kaolinit), ki so bili inkubirani v gojišču PKS 1 uro oziroma 24 ur.	21
Sl. 12:	Delež pritrjenih celic <i>Pseudoalteromonas</i> sp. po 1 uri na različnih koloidih (B – bentonit, K – kaolinit), ki so bili predinkubirani v gojišču PKS 1 uro oziroma 24 ur.	22

KAZALO PRILOG

- Pril. A: Rast seva *Pseudoalteromonas* sp. v različnih tekočih gojiščih: Kontrola - gojišče PKS, K - gojišče PKS predinkubirano s kaolinitom, B - gojišče PKS predinkubirano z bentonitom.
- Pril. B1: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO₂ v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS s kaolinitom (K) in v gojišču PKS z bentonitom (B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,008 g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 1 uro.
- Pril. B2: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO₂ v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS s kaolinitom (K) in v gojišču PKS z bentonitom (B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,04 g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 1 uro.
- Pril. B3: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO₂ v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS s kaolinitom (K) in v gojišču PKS z bentonitom (B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,04g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 24 ur.
- Pril. B4: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO₂ v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS z odstranjenim kaolinitom (PKE-K) in v gojišču PKS z odstranjenim bentonitom (PKE-B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,04g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 24 ur.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_{562}	absorbanca pri $\lambda = 562$ nm
BSA	goveji serumski albumin (ang. » <i>bovine serum albumin</i> «)
CEC	kationska izmenjevalna kapaciteta (ang. » <i>cation exchange capacity</i> «)
CFU	kolonijske enote (ang. » <i>colony forming units</i> «)
$CO_{2,kon}$	končna koncentracija CO_2 v plinski fazi
$CO_{2,zač}$	začetna koncentracija CO_2 v plinski fazi
K	nosilnost okolja (maksimalna OD_{650})
OD_{650}	turbidnost pri $\lambda = 650$ nm
$OD_{650,t0}$	turbidnost pri $\lambda = 650$ nm pri $t = 0$
PKS	bogato gojišče (<i>pepton, kvasni ekstrakt, soli</i>)
reagent A	raztopina bikinkoninske kisline
reagent B	4 % (v/v) raztopina $CuSO_4$
μ	hitrost rasti

1 UVOD

Koloidni delci, tako organski kot anorganski, so splošno razširjeni in prisotni v naravnem okolju. Organski koloidi so lahko vir hranil za bakterije in protozoje, anorganski koloidi pa na svoji površini vežejo različne snovi, med njimi tudi hranila, katerih lokalna koncentracija se na površini koloidov lahko znatno poveča. Posledica je znižana koncentracija hranil za bakterije v raztopini. Ta hranila so dostopna bakterijam, ki se uspejo pritrčiti na delce. Na koloidnih delcih je bakterijski metabolizem lahko bolj intenziven, ker so hranila skoncentrirana.

Zelo pomembni anorganski koloidi so minerali glin, ki predstavljajo večino koloidne frakcije v tleh, sedimentih in vodi. Nekateri minerali so nizko reaktivni z majhno specifično površino (npr. kaolinit), nekateri pa imajo veliko specifično površino in imajo visoko sposobnost vezave nabitih delcev oziroma visoko kapaciteto za izmenjevanje kationov (npr. montmorillonit). Zaradi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti imajo ti minerali različen vpliv na vezavo hranil in bakterij na koloidne delce.

V diplomski nalogi smo ugotavljali vpliv mineralov glin na rast in hitrost respiracije morske bakterije *Pseudoalteromonas* sp., in sicer smo proučevali vpliv vrste gline (bentonita, kot predstavnika montmorillonita, in kaolinita), vpliv koncentracije gline in vpliv časa predinkubacije gline v gojišču. Preverili smo tudi, v kolikšni meri se hranila vežejo na različne minerale glin ter, če sploh in koliko se bakterije pritrčajo na posamezne gline.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE LASTNOSTI KOLOIDOV

Koloidi so majhni delci, veliki od 0,001 μm do 1 μm , z veliko površino, in sicer so lahko organske snovi ali pa anorganski material (predvsem minerali glin). Ločimo tri vrste koloidov (Manahan, 2005):

- Hidrofilni koloidi – so makromolekule, za katere je značilna močna interakcija z vodo. Primer hidrofilnih koloidov so proteini in sintetični polimeri.
- Hidrofobni koloidi – zanje so značilne šibkejšje interakcije z vodo. Pozitivno ali negativno nabite površine koloidnih delcev in nasprotni ioni, ki obdajajo delce, tvorijo električni dvosloj, kar povzroči odbijanje delcev med seboj.
- Asociativni koloidi – so sestavljeni iz molekul, ki imajo v svoji molekularni strukturi hidrofobni in hidrofilni del in tvorijo micelle. Primer so mila in detergenti.

2.1.1 Razširjenost koloidov

Koloidni delci, tako organski kot anorganski, so splošno razširjeni in prisotni v naravnem okolju. Zelo številni so v talnih sistemih, kjer je običajno manj kot 5 % organske ter okoli 95 % anorganske snovi in v tej anorganski komponenti večinoma prevladujejo minerali glin (Manahan, 2005). Prav tako so koloidni delci številni tudi v vodnih okoljih (10^7 - 10^9 delcev/mL), kjer presegajo številčnost mikroorganizmov (Koiike in sod., 1990; Wells in Goldberg, 1991). Vendar pa so tu večinoma organski koloidi, nekaj pa je tudi anorganskih delcev, ki vsebujejo železo in aluminosilikate (Wells in Goldberg, 1991; Wells in Goldberg, 1992).

2.1.2 Izvor koloidov

Koloidni delci v vodnem okolju lahko nastajajo s sproščanjem organske snovi iz fitoplanktona, bakterij in protozojev (Decho, 1990; Nagata in Kirchman, 1991) ali pa med

virusno lizo celic (Proctor in Fuhrman, 1990; Shibata in sod., 1997). Lahko se sproščajo tudi z makroagregatov in fekalnih peletov (Smith in sod., 1992). Vendar pa so ti koloidi večinoma organski.

Anorganski koloidi (minerali glin) so sekundarni minerali, ki nastanejo s spremembo primarnih mineralov in kamnin pod vplivom fizikalnih, kemičnih in bioloških faktorjev pri procesih preperevanja (Wenk in Bulakh, 2004).

2.1.3 Vloga koloidov v vodnih okoljih

Koloidi imajo več pomembnih vlog. Organski koloidi so lahko vir hranil za bakterije in protozoje (Amon in Benner, 1994; Posch in Arndt, 1996). Koloidi se lahko zbirajo v večje skupke, ki skupaj z večjimi organskimi in anorganskimi delci tvorijo t.i. morski sneg in s tonjenjem v globino odnašajo hranila iz sistema (Wells in Goldberg, 1993). Taki veliki skupki so običajno množično poseljeni z bakterijami (Alldredge in Gotschalk, 1990; Shanks in Walters, 1997) in so mesto intenzivne mikrobne aktivnosti (Alldredge in Silver, 1988), ki z raztapljanjem suspendirane snovi vrača raztopljena hranila v sistem. Koloidi tudi pomembno vplivajo na biodostopnost različnih spojin, ker se le-te z vezavo na koloidne odnašajo iz sistema oziroma niso na voljo za razgradnjo. Razen tega koloidi lahko vplivajo na lastnosti medija (pH, koncentracijo hranil) in že s tem na rast organizmov.

2.2 MINERALI GLIN

Minerali glin so aluminosilikati in predstavljajo večino koloidne frakcije v tleh, sedimentih, kamninah in vodi (Luckham in Rossi, 1999). So pomembna komponenta talnih in vodnih ekosistemov, ker zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti lahko vplivajo na vezavo in s tem na pretok hranil v sistemu (Jenny, 1932). Ti mineralni koloidni delci so zelo majhni, z veliko površino, ki je elektrostatično nabita in adsorbira ione in molekule. Med vsemi minerali v tleh, imajo ravno minerali glin največji vpliv na življenjske procese, saj se v tleh večina reakcij zgodi na površini glin in organskih snovi (Wenk in Bulakh, 2004).

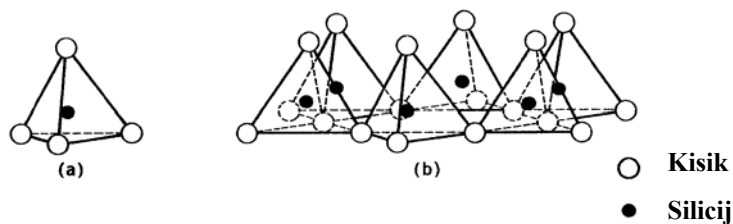
Pomembni skupini glin sta montmorillonit in kaolinit, ki se razlikujeta po splošni kemijski formuli, strukturi in fizikalno-kemijskih lastnostih. Delci montmorillonita so v primerjavi s kaolinitom manjši, z veliko večjo površino ter kationsko izmenjevalno kapaciteto (CEC), kar je prikazano v Preglednici 1 (Wenk in Bulakh, 2004; Manahan, 2005).

Preglednica 1: Primerjava fizikalno-kemijskih lastnosti med montmorillonitom in kaolinitom (Wenk in Bulakh, 2004; Manahan, 2005).

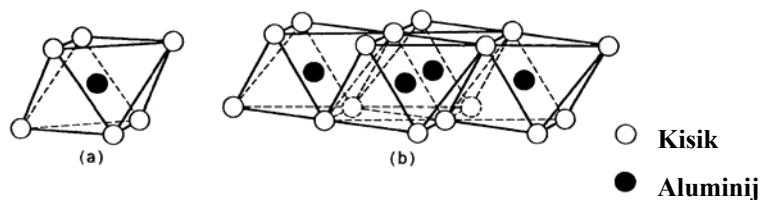
	Montmorillonit	Kaolinit
Splošna formula	$\text{Al}_2(\text{OH})_2\text{Si}_4\text{O}_{10}$	$\text{Al}_2(\text{OH})_4\text{Si}_2\text{O}_5$
Velikost delcev (μm)	0,01-1	0,1-5
Površina (m^2/g)	600-800	10-20
CEC (cmol/kg)	80-120	1-10

2.2.1 Struktura mineralov glin

Minerali glin so sestavljeni iz plasti silicijevih oksidov in plasti aluminijevih oksidov. Plast silicijevih oksidov, imenovana tetrahedralna plast (Slika 1b), je sestavljena iz Si – tetrahedrov (Slika 1a), v katerih je vsak atom silicija obdan s štirimi kisikovimi atomi. Plast aluminijevih oksidov (oktahedralna plast; Slika 2b) tvorijo Al – oktahedri (Slika 2a), kjer je vsak aluminijev atom obdan s šestimi kisikovimi atomi v oktahedralni koordinaciji (Wenk in Bulakh, 2004; Manahan, 2005).

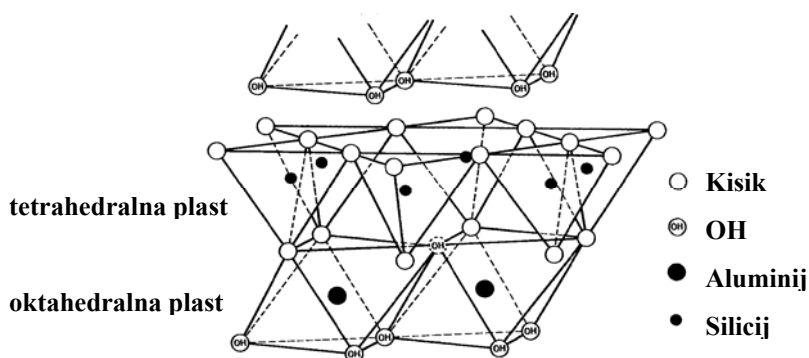


Slika 1: (a) Si – tetrahedron in (b) tetrahedralna plast (Grim, 1968).

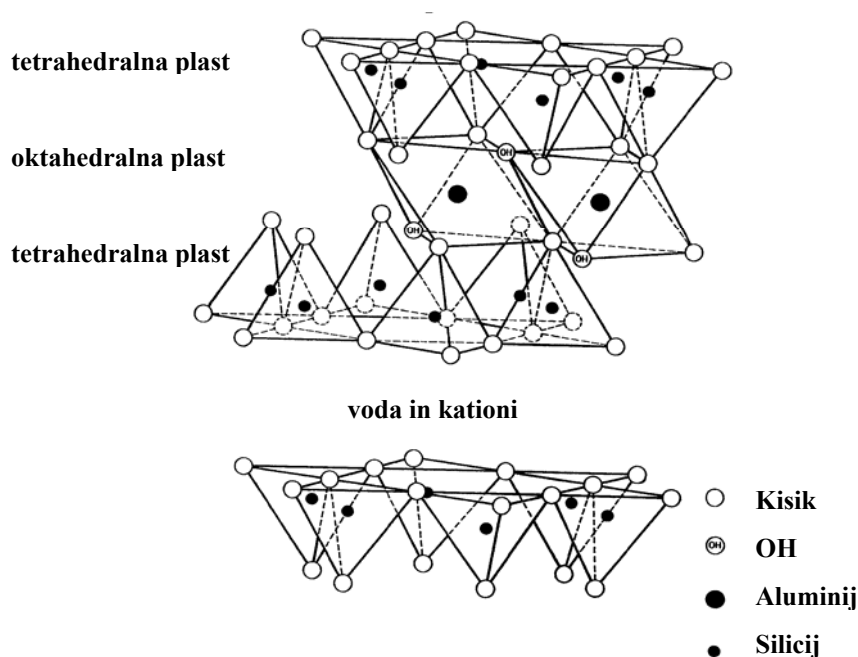


Slika 2: (a) Al – oktahedron in (b) oktahedralna plast (Grim, 1968).

Ločimo dva tipa osnovnih strukturnih enot: 1:1 struktura, značilna za kaolinit (Slika 3), kjer je tetrahedralna plast pritrjena na eno stran oktahedralne plasti, in 2:1 struktura, značilna za montmorillonit (Slika 4), kjer so tetrahedralne plasti pritrjene na obe strani oktahedralne plasti. Osnovne enote koloidnega minerala so naložene ena na drugo in povezane s šibkimi van der Waalsovimi vezmi pri montmorillonitu, pri kaolinitu pa z vodikovimi vezmi. Montmorillonit lahko med osnovne enote absorbira velike količine vode, katione in večje organske molekule, kar povzroči nabrekanje gline, za razliko od kaolinita, kjer so ti medstloji zaprti za vodo (Wenk in Bulakh, 2004). Zato se minerala znatno razlikujeta v sposobnosti vezave hranil iz okolice.



Slika 3: Struktura kaolinita – 1:1 struktura (Grim, 1968).



Slika 4: Struktura montmorillonita – 2:1 struktura (Grim, 1968).

2.3 VEZAVA HRANIL NA KOLOIDE

Z adsorpcijo makromolekul na fazni meji med tekočino in trdno površino nastane površinski organski film. Biološke makromolekule so v naravnem okolju prisotne v nizkih koncentracijah in z vezavo na površine se povečajo lokalne koncentracije hranil. Na površine se lahko vežejo najrazličnejše spojine: amonij (Goldberg in Gainey, 1955), alkani in izoprenoidi (Boehm in Quinn, 1973), bifenil (Calvillo in Alexander, 1996), toluen (Robinson in sod., 1990), naftalen (Guerin in Boyd, 1992), anorganski Fe, Mn, Al in P (Sholkovitz, 1976), amini (Wszolek in Alexander, 1979), karboksilne kisline (Ogram in sod., 1985), sukcinat (Hattori R in Hattori T, 1963), aminokisline (Dashman in Stotzky, 1982, 1986; Gordon in sod., 1983), peptidi (Dashman in Stotzky, 1984, 1986), proteini (Marshman in Marshall, 1981; Nagata in Kirchman, 1996), različni herbicidi (Ogram in sod., 1985; Tang in sod., 1998), pa tudi kompleksna organska snov iz fitoplanktonskih celic (Satterberg in sod., 2003).

Količina vezanih spojin je odvisna od vrste spojine in vrste gline, na katero se vežejo. Običajno se zniža dostopnost hranil v raztopini za bakterije, včasih pa so vezane snovi popolnoma nedostopne (Stotzky, 1972; Marshman in Marshall, 1981; Dashman in Stotzky,

1986; Ogram in sod., 1985). Gordon in Millero (1985) sta opazila negativno korelacijo med adsorpcijo nizkomolekularnih organskih kislin in sladkorjev na hidroksiapatit, in stopnjo bakterijske razgradnje teh snovi v prisotnosti minerala. Podobno sta Arnarson in Keil (2005) opazila, da agregacija suspendirane fitoplanktonske organske snovi z mineralnimi delci zmanjša mikrobo razgradnjo, ker večina organske snovi preide v visokomolekularno frakcijo in je bolj odporna proti razgradnji.

Včasih pa se lahko hranila odcepijo s koloidov (desorpcija) in so spet dostopna za razgradnjo. Desorpcijo lahko sprožijo mikroorganizmi preko spremembe pH v neposredni okolici ali pa do desorpcije pride zaradi premika kemijskega ravnotežja, ko se koncentracija hranil v raztopini zmanjša zaradi bakterijske razgradnje. Ker je koncentracija hranil na površini višja od koncentracije v raztopini, hranila desorbirajo s površine (Wszolek in Alexander, 1979).

Kljub številnim pokazateljem, da vezava na minerale zmanjša stopnjo razgradnje, obstajajo tudi študije, ki kažejo na uspešno razgradnjo vezanih snovi, predvsem organskih onesnaževal (Guerin in Boyd, 1992; Tang in sod., 1998; Calvillo in Alexander, 1996). Dostopnost vezanih hranil je odvisna tudi od bakterijske združbe. Lahko se zgodi, da posamezna vrsta bakterij ni zmožna razgradnje vezanih hranil, medtem ko neka druga vrsta ali pa združba večih vrst mikroorganizmov uspešno razgradi vezano snov (Calvillo in Alexander, 1996; Guerin in Boyd, 1992; Tang in sod., 1998).

2.4 PRITRJANJE MIKROORGANIZMOV NA DELCE

Večina mikroorganizmov v naravnih sistemih je pritrjena in raste na površini. Pritrjanje kot način življenja je poznano že več kot 70 let (Waksman in sod., 1933) in prvi poskusi so bili izvajani na steklu, porcelanu, plastiki in kovini. Število bakterij na površinah je do 10-krat presegalo število bakterij v raztopini (ZoBell, 1943). Bakterije se bolj uspešno pritrjajo na hidrofilne, pozitivno nabite površine. Rast na površinah se izraža v obliki posameznih kolonij ali pa v obliki biofilma, v katerem je metabolična aktivnost močno povečana.

2.5 VPLIVI KOLOIDNIH DELCEV NA BAKTERIJSKO AKTIVNOST

Dodatek koloidnih delcev v raztopino ima lahko pozitivne ali negativne učinke na bakterijsko aktivnost. Delci, ki so manjši od bakterijskih celic, se lahko vežejo na površino celice in tako ovirajo asimilacijo hranil (McCalla, 1940a). Podoben pojav sta Lavie in Stotzky (1986) opazila pri glivah, kjer je vezava glinenih mineralov na hife ovirala respiracijo. Pri večjih delcih je izrazit vpliv vezave hranil, s katero se zmanjša njihova dostopnost. Ta hranila so potem dostopna bakterijam, ki se uspejo pritrčiti na delec. Na samih delcih je bakterijski metabolizem lahko bolj intenziven, ker so hranila skoncentrirana, in bakterije še hitreje rastejo (Heukelekian in Heller, 1940; ZoBell, 1943; Bright in Fletcher, 1983).

Zaradi visoke kapacitete za izmenjavo kationov lahko nekateri minerali, predvsem montmorillonit, vežejo med bakterijsko rastjo nastale protone in uravnavajo ugoden pH za rast (Stotzky in Rem, 1966) in encimsko aktivnost (Kunc in Stotzky, 1970). Poleg tega lahko z vezavo toksičnih snovi zmanjšajo nivo toksičnosti v okolici (McCalla, 1940b). Prav tako lahko adsorpcija določenih inhibitorjev in odstranitev le-teh iz raztopine poveča bakterijsko rast (Harwood in Pirt, 1972).

2.5.1 Primerjava aktivnosti pritrjenih in nepritrjenih bakterij

Številne študije so primerjale aktivnosti pritrjenih in prosto plavajočih bakterij. Rezultati teh študij so različni in ne kažejo na nek sistemski učinek površin (Bell in Albright, 1982; Bright in Fletcher, 1983; Van Loosdrecht in sod., 1990; Bonin in sod., 2001). Običajno so rezultati odvisni od vrste organizma, narave in koncentracije substrata, strukture in sestave površine, fizikalno-kemijskih parametrov gojišča, fiziologije celic, in parametra, ki je bil merjen. Ker se na površinah koncentrirajo hranila, lahko pričakujemo, da so pritrjene bakterije bolj aktivne, kar kažejo zgodnje študije (ZoBell in Anderson, 1936; Stark in sod., 1938; ZoBell, 1943), pa tudi mnoge poznejše. Povišana aktivnost pritrjenih bakterij je bila pokazana na glukozi (Fletcher, 1986; Ayo in sod., 2001), aminokislinah (Ayo in sod., 2001), laktatu in ketonu (Bonin in sod., 2001), in odmrlih celicah morske trave (Anesio in

sod., 2003). Vendar pa je ta učinek opažen predvsem pri nizkih koncentracijah ('pomanjkanju') hranil v raztopini (Heukelekian in Heller, 1940; ZoBell, 1943).

Po drugi strani pa določene raziskave kažejo, da pritrđitev bakterij pomeni zmanjšano aktivnost (Estermann in McLaren, 1959; Gordon in sod., 1983), ker imajo pritrjene bakterije manjšo aktivno površino kot proste celice (Hattori R in Hattori T, 1963; Jeffrey in Paul, 1986). Ayo in sod. (2001) so ugotovili, da do razlik v aktivnostih med pritrjenimi in nepritrjenimi bakterijami lahko pride zaradi razlik v transportnih sistemih, ki imajo pri pritrjenih celicah nizko afiniteto, ki je sicer značilna za visoke koncentracije substrata. To pomeni, da so vzroki lahko v spremenjenem metabolizmu celice, ne pa samo v visoki koncentraciji hranil. Poleg tega so razlogi za razlike v aktivnosti lahko v tem, da so na fazni meji trdno-tekoče drugačni fizikalno-kemijski pogoji (npr. pH, sama koncentracija substrata) kot v raztopini (Hattori R in Hattori T, 1963). Vezava hranil oziroma večjih molekul lahko vpliva na njihovo konformacijo in s tem na razgradljivost – hranila lahko postanejo bolj dostopna ali pa popolnoma nedostopna za mikrobno razgradnjo (Stotzky, 1972).

2.5.2 Primerjava med kaolinitom in montmorillonitom

Vpliv mineralov glin na vezavo hranil in aktivnost bakterij se pogosto preverja na kaolinitu in montmorillonitu, ki sta tipična predstavnika glin z nizko oziroma visoko kationsko izmenjevalno kapaciteto, vendar se rezultati teh raziskav razlikujejo. V splošnem ima montmorillonit opazno večji vpliv, ker veže večji delež hranil (Marshman in Marshall, 1981; Satterberg in sod., 2003) in s tem tudi v večji meri zavira rast organizmov oziroma prepreči razgradnjo (Lavie in Stotzky, 1986; O'Loughlin in sod., 2000; Nováková, 1970). V nekaterih primerih pa je bila aktivnost bakterij večja, saj je dodatek montmorillonita pospešil bakterijsko respiracijo (Stotzky in Rem, 1966), ali razgradnjo substrata (Kunc in Stotzky, 1970), medtem ko je dodatek kaolinita imel le majhen učinek (Stotzky in Rem, 1966). Nekatere raziskave pa kažejo, da dodatek kaolinita povzroči povišano bakterijsko rast (Conn HJ in Conn JE, 1940).

Glede na nasprotujoče si trditve v literaturi o vplivu montmorillonita in kaolinita na bakterijsko aktivnost smo v diplomski nalogi proučevali, kako dodatek omenjenih koloidov vpliva na vezavo hranil in aktivnost bakterije *Pseudoalteromonas* sp. v raztopini. Glavna hipoteza v diplomski nalogi je, da se hranila iz gojišča vežejo na dodane koloide, s čimer postanejo nedostopna bakterijam v raztopini, ki zato slabše rastejo.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

- Bogato gojišče (gojišče PKS):

pepton (Biolife, Italija)	3 g/L
kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)	0,6 g/L
MgCl ₂ × 6H ₂ O (Merck, Nemčija)	2 g/L
NaCl (Merck, Nemčija)	30 g/L
destilirana voda	1 L
agar (Biolife, Italija) (za trdna gojišča)	18 g/L

- Rastopina soli:

Tris baza (pH 7,2) (Merck, Nemčija)	6,1 g/L
NaCl (Merck, Nemčija)	17,6 g/L
K ₂ HPO ₄ (Merck, Nemčija)	0,075 g/L
NH ₄ Cl (Merck, Nemčija)	1 g/L
CaCl ₂ × 2H ₂ O (Merck, Nemčija)	1,45 g/L
KCl (Merck, Nemčija)	0,75 g/L
MgSO ₄ × 7H ₂ O (Merck, Nemčija)	12,3 g/L
destilirana voda	1 L

- Reagenti za določanje proteinov:

bikinkoninska kislina (Sigma)
 4 % (v/v) CuSO₄ (Sigma)
 standard govejega serumskega albumina (BSA, Sigma), 1 mg/mL

- Koloidi:

bentonit (AEB, Italija)
 kaolinit (proizvajalec neznan)

- CO₂ (Messer)

3.2 BAKTERIJSKI SEV

Uporabili smo sev *Pseudoalteromonas* sp., ki je bil izoliran iz vode iz Sečoveljskih solin in tvori belorumene kolonije. Izolat smo vzdrževali pri 4°C s precepljanjem na sveža trdna PKS gojišča enkrat mesečno. Tekoče kulture seva *Pseudoalteromonas* sp. smo gojili aerobno v tekočem gojišču PKS pri 28°C v temi na stesalniku pri 200 obr/min.

3.3 EKSPERIMENTALNI SISTEM

V eksperimentalnem sistemu smo ugotavljali hitrost rasti in respiracije seva *Pseudoalteromonas* sp. v gojišču PKS, v katero smo predhodno dodali minerale glin. Opazovali smo vpliv koncentracije koloidov, vrste koloidov in časa predinkubacije koloidov v gojiščih. Sev *Pseudoalteromonas* sp. smo gojili bodisi v gojišču s koloidi, bodisi v gojišču, v katerem smo koloide po predinkubaciji odstranili pred nacepljanjem seva *Pseudoalteromonas* sp.. Kontrolo je predstavljalo gojišče brez dodanih koloidov.

3.4 HITROST RASTI IN NOSILNOST OKOLJA V GOJIŠČIH S KOLOIDI

Gojišče PKS, kamor smo dodali bentonit oziroma kaolinit (0,04 g/mL), smo avtoklavirali 15 minut pri 121°C in nato inkubirali 24 ur na stresalniku pri 200 obr/min pri 28°C. V tem času so se hranila iz gojišča vezala na koloide. Po tej predinkubaciji smo odstranili večje koloidne delce iz gojišča s centrifugiranjem v sterilnih centrifugirkah (15 minut, 13000 obr/min) in supernatant uporabili kot rastno gojišče za *Pseudoalteromonas* sp.. Rast smo spremljali spektrofotometrično (Iskra - Photometer MA 9510) z merjenjem turbidnosti pri 650 nm (OD_{650}). Iz rastnih krivulj (Priloga A) smo določili hitrost rasti in nosilnost okolja s prileganjem eksperimentalnih podatkov naslednji logistični enačbi:

$$OD_{650}(t) = \frac{K \times OD_{650,t_0} \times e^{\mu t}}{OD_{650,t_0} \times (e^{\mu t} - 1) + K}, \quad \dots (1)$$

v kateri je K nosilnost okolja (maksimalna OD_{650}), μ je hitrost rasti, t je čas, in OD_{650,t_0} je turbidnost pri $t = 0$.

3.5 HITROST RESPIRACIJE V GOJIŠČIH S KOLOIDI

Vpliv koloidov na hitrost respiracije seva *Pseudoalteromonas* sp. smo ugotavljali z merjenjem produkcije CO₂ v 1 uri. Predpostavili smo, da se biomasa *Pseudoalteromonas* sp. med tem časom ni spremenila.

3.5.1 Priprava gojišč s koloidi in bakterijske kulture *Pseudoalteromonas* sp.

V različnih eksperimentalnih variantah smo v 15 mL-steklenice nalili 5 mL gojišča PKS ter zatehtali izbrane mase (0,04 ali 0,2 g) izbranih koloidov (bentonit ali kaolinit). Steklenice smo pokrili z alu-folijo, avtoklavirali 15 minut pri 121°C in nato predinkubirali določen čas (1 uro ali 24 ur) na stresalniku pri 200 obr/min v temi pri 28°C. Tako smo pripravili gojišča s koloidi. Poleg tega smo pripravili tudi gojišča, iz katerih smo po končani predinkubaciji odstranili večje koloidne delce s centrifugiranjem (15 minut, 13000 obr/min) in supernatant uporabili kot gojišče. V tako pripravljena gojišča smo dodali 50 µl bakterijske kulture *Pseudoalteromonas* sp.. Bakterijsko kulturo smo predhodno koncentrirali, tako da smo 100 mL prekončne kulture *Pseudoalteromonas* sp. v PKS centrifugirali v sterilnih centrifugirkah 15 minut pri 13000 obr/min in usedlino resuspendirali v 1 mL sterilne raztopine soli. Celice smo koncentrirali, ker smo hoteli visok signal pri merjenju produkcije CO₂.

3.5.2 Merjenje produkcije CO₂

Takoj po nacepljanju bakterijske kulture *Pseudoalteromonas* sp. v pripravljena gojišča smo steklenice plinotesno zaprli s sterilnimi gumijastimi zamaški. Z injekcijsko brizgalko smo iz plinske faze odvzeli 0,25 mL vzorca in na plinskem kromatografu (HP 5890) izmerili začetno količino CO₂. Nato smo kulturo stresali 1 uro pri 28°C pri 200 obr/min in ponovno izmerili količino CO₂. Iz teh podatkov smo izračunali količino nastalega CO₂ v 1 uri. Parametri kromatografa: kolona Porapak R 100/120 (180 cm/1,8 in), detektor TCD, nosilni plin He (pretok 180 mL/min); temperature: injektor 100°C, kolona 50°C, detektor 100°C; integrator HP3392A. Kromatograf smo umerili z zunanjim standardom z znano koncentracijo CO₂.

3.5.3 Določanje količine proizvedenega CO₂

V eksperimentalnem sistemu celice med inkubacijo producirajo CO₂, obenem pa se nastali CO₂ v določeni meri raztaplja v gojišču oziroma se veže na komponente gojišča. Zato pri meritvi dobimo prenizko oceno za količino nastalega CO₂ in je potrebno izvesti korekcijo pri izračunu. V ta namen smo izvedli kontrolne eksperimente, v katerih smo v plinotesno zaprte steklenice z gojišči z injekcijsko brizgalko dodali znano količino CO₂, takoj izmerili količino dodanega CO₂ (CO_{2,zač}) in gojišče inkubirali 1 uro (enako kot pri variantah s celicami). Po 1 uri smo izmerili količino preostalega CO₂ v plinski fazi (CO_{2,kon}). Eksperiment smo ponovili z različnimi količinami dodanega CO₂. Umeritvene krivulje smo narisali za vsako eksperimentalno varianto (gojišče) posebej (Priloga B) in iz umeritvenih krivulj določili količino proizvedenega CO₂.

Po dodatku CO₂ smo preverili, kakšen je karakteristični čas, oziroma kako hitro se CO₂ veže na komponente gojišča. V plinotesno zaprto steklenico z gojiščem PKS in koloidi (bentonit; 0,008 g/mL; predinkubacija - 1 ura) smo z injekcijsko brizgalko dodali CO₂ in takoj izmerili količino dodanega CO₂ v plinski fazi ter ponovno po 10, 30, 40 in po 60 minutah. Med meritvami smo gojišče inkubirali v temi pri 28°C na stresalniku pri 200 obr/min. Iz dobljenih podatkov smo nato določili karakteristični čas, oziroma kako hitro se v takem sistemu vzpostavi ravnovesje med vezanim, raztopljenim in nevezanim CO₂.

3.6 DOLOČANJE VEZAVE HRANIL NA KOLOIDE

Zanimalo nas je, koliko hranil se veže na koloide, če gojišče s koloidi inkubiramo različno dolgo. V ta namen smo avtoklavirana gojišča PKS s posameznimi koloidi (bentonit, kaolinit; 0,04 g/mL) inkubirali 1 uro ali 24 ur (na stresalniku pri 200 obr/min, 28°C, v temi). Po končani inkubaciji smo odvzeli vzorce (1,2 mL) ter jih centrifugirali (15 minut, 13000 obr/min), tako da so se večji koloidni delci z vezanimi hranili posedli. Nato pa smo določili, koliko hranil je ostalo v supernatantu z določanjem koncentracije proteinov v raztopini.

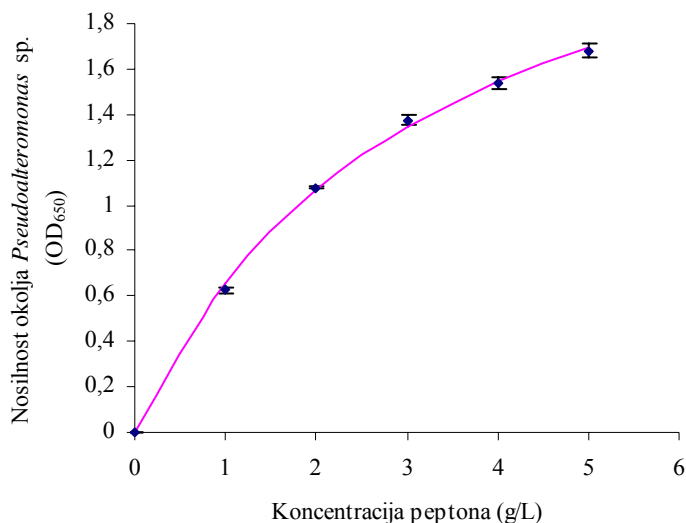
Koncentracijo proteinov smo določili po metodi BCA (Smith in sod., 1985). Komercialni kit (Sigma-Aldrich, Inc.) vsebuje reagent A (raztopino bikinkoninske kisline), reagent B (4 % (v/v) raztopino CuSO_4) in standardno raztopino govejega serumskega albumina (BSA, 1 mg/mL). 100 μl gojišča smo dodali v 2 ml reagenta BCA (mešanica A:B = 50:1). Mešanico smo premešali in inkubirali 15 min pri 60°C. V tem času je potekla barvna reakcija. Suspenzijo smo ohladili na sobno temperaturo in izmerili absorbanco pri 562 nm (A_{562} ; Phillips UV/Visible Spectrophotometer PU8620). Za slepo probo smo uporabili mešanico 100 μl dH_2O in 2 ml reagenta BCA. Koncentracijo proteina v vzorcu smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki smo jo narisali z nanašanjem različnih koncentracij standarda BSA (v območju 0-1 mg/mL) proti izmerjenim vrednostim A_{562} .

3.7 DOLOČANJE PRITRJANJA CELIC NA KOLOIDE

Da bi ugotovili, koliko celic *Pseudoalteromonas* sp. se pritrdi na različne koloide v 1 uri, smo uporabili viabilno štetje (štetje CFU). V avtoklavirana gojišča PKS s posameznimi koloidi (bentonit, kaolinit; 0,04 g/mL), ki smo jih predinkubirali 1 uro oziroma 24 ur, smo dodali celice *Pseudoalteromonas* sp.. Po 1 uri inkubacije (na stresalniku pri 200 obr/min, 28°C, v temi) smo odvzeli vzorce (1 mL), ki smo jih centrifugirali 30 sekund pri 3000 obr/min, tako da so se koloidni delci in nanje pritrjene celice posedli, nepritrjene celice pa so ostale v supernatantu. Posamezne redčitve supernatanta smo nacepili na trdna gojišča PKS. Za ovrednotenje začetnega stanja smo na trdna gojišča PKS nacepili tudi ustrezne redčitve inokuluma. Po 48-urni inkubaciji (v temi, 28°C) smo določili CFU/mL inokuluma in CFU/mL v raztopini po 1 uri inkubacije ter izračunali deleže pritrjenih celic na različnih koloidih.

4 REZULTATI

Ker je vpliv koloidov na rast *Pseudoalteromonas* sp. odvisen od razmerja med koncentracijo hranil in koloidov v raztopini, smo najprej določili vpliv koncentracije hranil v bogatem gojišču PKS na nosilnosti okolja *Pseudoalteromonas* sp. Kot je razvidno iz Slike 5, pri višjih koncentracijah hranil v gojišču prihaja do zasičenja in nosilnost okolja limitira proti maksimalni nosilnosti. Ker pričakujemo, da je pri višjih koncentracijah hranil vpliv koloidov na spremembo nosilnosti okolja za *Pseudoalteromonas* sp. relativno majhen, zaradi visokega razmerja med hranili in koloidi, smo v nadaljnjem delu uporabili samo gojišča v katerih je bila koncentracija PKS enaka 3 g peptona/L in 0,6 g kvasnega ekstrakta/L. Takšna koncentracija omogoča dobro rast *Pseudoalteromonas* sp., obenem pa je vpliv nasičenosti hranil na odzivnost sistema po dodatku koloidov relativno majhen.

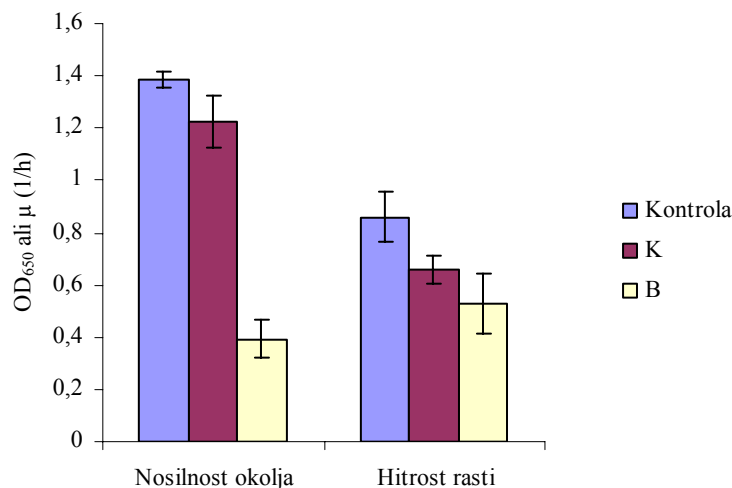


Slika 5: Nosilnosti okolja seva *Pseudoalteromonas* sp. v gojiščih PKS z različnimi koncentracijami peptona in kvasnega ekstrakta.

4.1 HITROST RASTI IN NOSILNOST OKOLJA V GOJIŠČIH S KOLOIDI

Na Sliki 6 vidimo, da sta bili nosilnost okolja in hitrost rasti seva *Pseudoalteromonas* sp. v primerjavi s kontrolo v splošnem slabši v gojiščih, ki smo jih predinkubirali s koloidi. Nosilnost okolja je bila najmanjša v gojišču predinkubiranem z bentonitom, kjer se je zmanjšala za več kot 70 %. Tu je bila tudi hitrost rasti najmanjša. Nekoliko večjo hitrost

rasti je opaziti v gojišču predinkubiranem s kaolinitom, vendar je hitrost še vedno manjša kot pri kontroli. Prav tako je tu manjša nosilnost okolja, in sicer za 12 %.

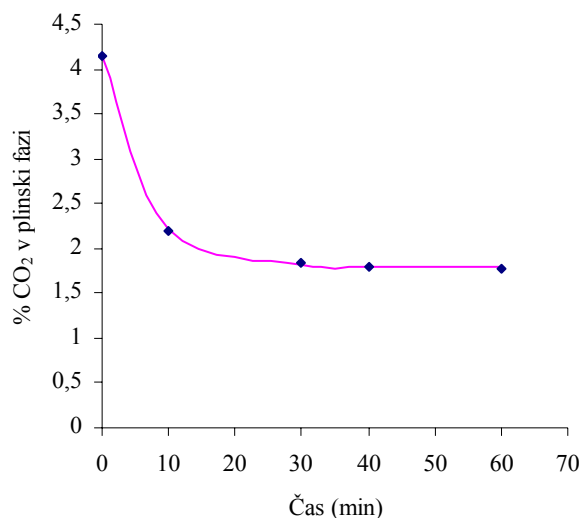


Slika 6: Nosilnost okolja in hitrost rasti seva *Pseudoalteromonas* sp. v različnih gojiščih: Kontrola - gojišče PKS, K - gojišče PKS predinkubirano s kaolinitom, B - gojišče PKS predinkubirano z bentonitom. Čas predinkubacije gojišča s koloidi je bil 24 ur. Koncentracija gojišča PKS je bila enaka 3 g peptona/L in 0,6 g kvasnega ekstrakta/L. Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni ($n = 3$).

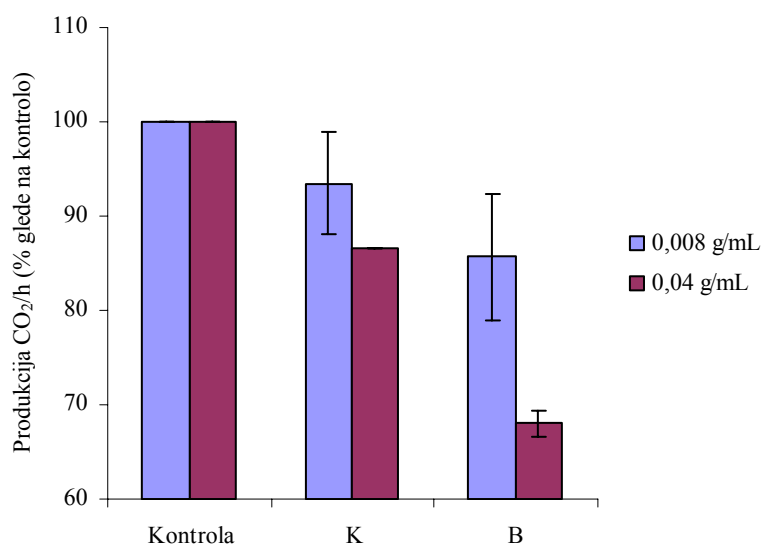
4.2 HITROST RESPIRACIJE V GOJIŠČIH S KOLOIDI

4.2.1 Vzpostavitev ravnovesja

Zaradi produkcije CO_2 v eksperimentalnem sistemu nas je zanimalo, kako hitro se vzpostavi ravnovesje med CO_2 v raztopini in CO_2 v atmosferi. V kolikor bi se ravnovesje vzpostavljalo zelo počasi, bi to namreč vplivalo na točnost podatka o količini proizvedenega CO_2 v sistemu. V ta namen smo v sistem z gojiščem dodali CO_2 in spremljali količino CO_2 v plinski fazi po času. Iz Slike 7 vidimo, da se ravnovesje med vezanim in nevezanim CO_2 vzpostavi zelo hitro. Matematično določen karakteristični čas oziroma čas, v katerem se vzpostavi ravnovesje je znašal 5,7 minut. To pomeni, da se znotraj eksperimenta, ki traja eno uro, ravnovesje lahko vzpostavi.

Slika 7: Hitrost raztapljanja CO₂ v gojišču s koloidi.

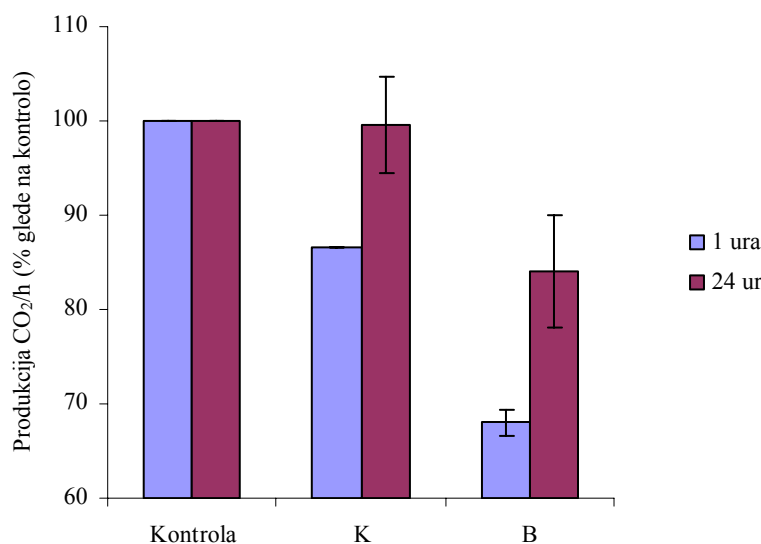
4.2.2 Vpliv koncentracije koloidov na hitrost respiracije



Slika 8: Vpliv različnih koncentracij koloidov (0,008 g/mL oz. 0,04 g/mL) na produkcijo CO₂ seva *Pseudoalteromonas* sp. v gojiščih s koloidi. Čas predinkubacije gojišča s koloidi je bil 1 h. Kontrola - gojišče PKS brez koloidov. K - gojišče PKS s kaolinitom. B - gojišče PKS z bentonitom. Produkcija CO₂ v kontroli je predstavljal 100 % respiracijo. Vrednosti v variantah s koloidi smo normirali na vrednost, dobljeno v kontroli. Rezultati so predstavljeni kot povprečja ± standardna napaka povprečij (n = 2-4).

Iz Slike 8 je razvidno, da je bila hitrost respiracije *Pseudoalteromonas* sp. v primerjavi s kontrolo manjša ob prisotnosti koloidov, in sicer je bila najmanjša v sistemu z dodanim bentonitom, tako pri višji kot pri nižji koncentraciji koloidov. Ne glede na vrsto koloida je bila pri višji koncentraciji koloidov (0,04g/mL) respiracija manjša kot pri nižji koncentraciji (0,008 g/mL). V sistemu s kaolinitom je bila respiracija pri nižji koncentraciji koloidov manjša za 7 % od respiracije pri kontroli, pri višji koncentraciji pa za 13 %. V sistemu z bentonitom pa je bilo vidno zmanjšanje respiracije pri nižji koncentraciji koloidov za 14 %, pri višji koncentraciji pa za več kot 30 %.

4.2.3 Vpliv časa predinkubacije gojišča s koloidi na hitrost respiracije

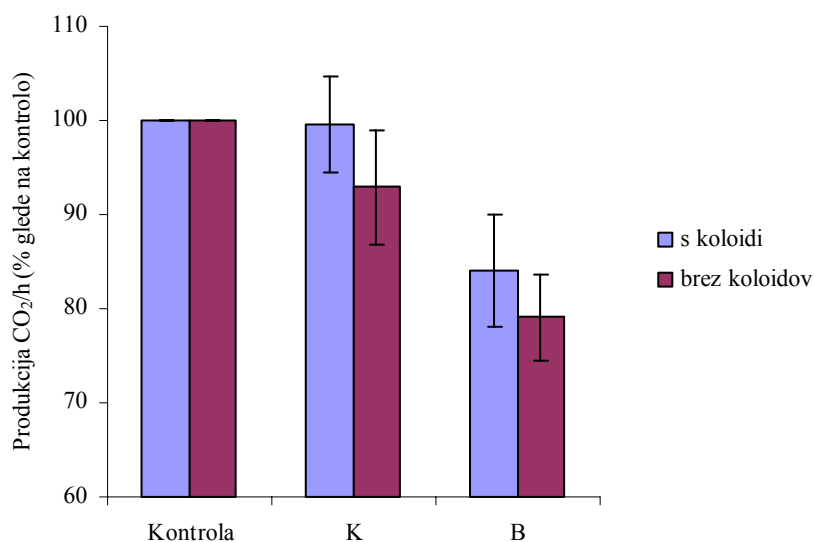


Slika 9: Vpliv časa predinkubacije gojišča s koloidi (1 ura, 24 ur) na produkcijo CO₂ seva *Pseudoalteromonas* sp.. Koncentracije koloidov so bile v obeh primerih 0,04 g/mL. Kontrola - gojišče PKS brez koloidov. K - gojišče PKS s kaolinitom. B - gojišče PKS z bentonitom. Produkcija CO₂ v kontroli je predstavljala 100 % respiracijo. Vrednosti v variantah s koloidi smo normirali na vrednost, dobljeno v kontroli. Rezultati so predstavljeni kot povprečja ± standardna napaka povprečij (n = 2-4).

Na Sliki 9 vidimo, da je bila produkcija CO₂ večja pri daljši predinkubaciji. Pri 1-urni predinkubaciji se je produkcija CO₂ zmanjšala za 13 % pri kaolinitu in za 32 % pri bentonitu glede na kontrolo. S podaljšanjem časa predinkubacije se je pri kaolinitu produkcija CO₂ povečala in je bila primerljiva tisti pri kontroli. Pri bentonitu se je pri 24-

urni predinkubaciji produkcija CO₂ sicer povečala glede na 1-urno predinkubacijo, vendar je bila skupna produkcija CO₂ še vedno manjša kot pri kontroli.

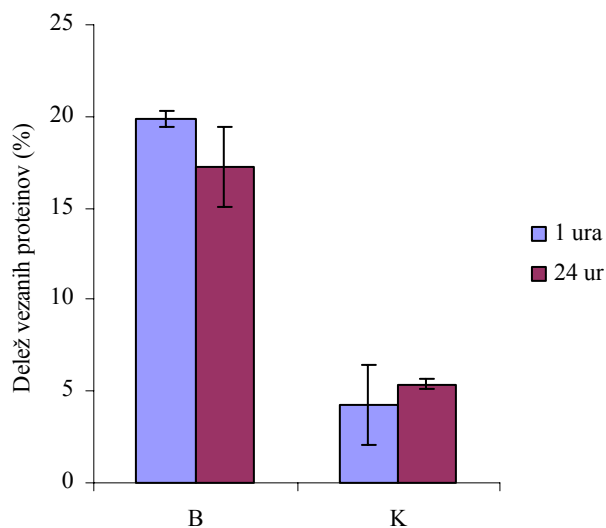
4.2.4 Vpliv odstranitve koloidov iz gojišč na hitrost respiracije



Slika 10: Produkcija CO₂ v gojišču s koloidi in v gojišču, v katerem smo inkubirali koloide in jih nato odstranili. Koncentracije koloidov so bile v obeh primerih 0,04 g/mL, čas predinkubacije je bil 24 ur. Kontrola - gojišče PKS brez koloidov. K - gojišče PKS predinkubirano s kaolinitom. B - gojišče PKS predinkubirano z bentonitom. Produkcija CO₂ v kontroli je predstavljala 100 % respiracijo. Vrednosti v variantah s koloidi smo normirali na vrednost, dobljeno v kontroli. Rezultati so predstavljeni kot povprečja ± standardna napaka povprečij (n = 3-4).

Iz Slike 10 je razvidno, da je po odstranitvi koloidov, na katere so se lahko vezala hranila, iz sistema, prišlo do zmanjšanja produkcije CO₂, tako pri bentonitu kot pri kaolinitu. Vendar je bilo zmanjšanje v okviru eksperimentalne napake nesignifikantno.

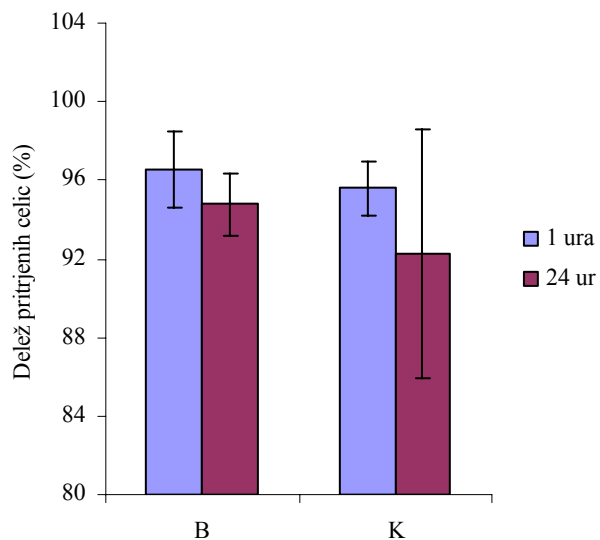
4.3 VEZAVA HRANIL NA RAZLIČNE KOLOIDE



Slika 11: Delež vezanih proteinov na različnih koloidih (B – bentonit, K – kaolinit), ki so bili inkubirani v gojišču PKS 1 uro oziroma 24 ur. Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni ($n = 3$).

Na Sliki 11 vidimo, da se proteini iz gojišča PKS lahko vežejo na koloide, in sicer je opazna znatno večja vezava hranil na bentonit. Na bentonit se lahko veže skoraj 4-krat več proteinov kot na kaolinit. Ni pa opaziti signifikantnih razlik pri vezavi proteinov na koloide, če smo inkubirali koloide v gojišču 1 uro ali 24 ur.

Glede na to, da je bila nosilnost okolja pri bentonitu kar za 70 % nižja kot pri kontroli (Slika 6), bi glede na količino proteinov, ki so ostali v gojišču (80 %, Slika 11) pričakovali višjo rast *Pseudoalteromonas* sp.. Eden od možnih vzrokov bi lahko bila sprememba pH. Zato smo preverili tudi pH gojišč, ki so bila inkubirana s koloidi, in se je izkazalo, da se vrednosti razlikujejo od kontrole (kontrolno gojišče PKS – pH 6,8; gojišče PKS s kaolinitom – pH 7,7; gojišče PKS z bentonitom – pH 8,0). Vendar pa pH v tem območju ni imel vpliva na nosilnost okolja *Pseudoalteromonas* sp.. Možno je, da se zelo majhni delci, ki jih s centrifugiranjem nismo mogli odstraniti, vežejo na celice in s tem zavirajo rast (McCalla, 1940a).

4.4 PRITRJEVANJE CELIC *PSEUDOALTEROMONAS* SP. NA RAZLIČNE KOLOIDE

Slika 12: Delež pritrjenih celic *Pseudoalteromonas* sp. po 1 uri na različnih koloidih (B – bentonit, K – kaolinit), ki so bili predinkubirani v gojišču PKS 1 uro oziroma 24 ur. Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni ($n = 3$).

Tako na bentonit kot na kaolinit se bakterije lahko vežejo. Kot je razvidno iz Slike 12, se na bentonit in kaolinit v 1 uri pritrdi približno enak delež celic *Pseudoalteromonas* sp., ne glede na to ali so bili koloidi v gojišču predinkubirani 1 uro ali 24 ur, in sicer se na koloide veže okoli 95 % celic.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo proučevali, kako dodatek različnih koloidov rastnemu gojišču vpliva na rast in respiracijo seva *Pseudoalteromonas* sp.. Koloidi so prisotni v vseh okoljih in lahko zaradi svoje velike površine in naboja vplivajo na dostopnost in izrabo hranil. Zaradi tega smo v diplomski nalogi uporabili splošno sprejeto in uporabljeno bogato gojišče za rast bakterij, gojišče PKS, kateremu smo dodajali različne koncentracije bentonita in kaolinita.

5.1.1 Vpliv koloidov na hitrost rasti in nosilnost okolja

Dodatek koloidov je v vseh primerih vplival na rastne karakteristike bakterijske populacije. Hitrost rasti in nosilnost okolja seva *Pseudoalteromonas* sp. sta bili v gojiščih, predinkubiranih s koloidi, v primerjavi s kontrolo manjši, in sicer sta bili najmanjši v gojišču predinkubiranem z bentonitom. To je skladno z dejstvom, da se na bentonit veže večji delež hranil, kar je posledica dejstva, da ima bentonit veliko večjo specifično površino na katero se lahko vežejo hranila kot kaolinit.

5.1.2 Vpliv koloidov na hitrost respiracije

Dodatek koloidov v gojišče je vplival tudi na hitrost respiracije seva *Pseudoalteromonas* sp.. Hitrost respiracije je bila ob prisotnosti koloidov manjša v primerjavi s kontrolo, in sicer je imel največji vpliv ponovno bentonit. Takšen rezultat je zelo verjetno posledica dejstva, da se je na bentonit vezalo 4-krat več hranil kot na kaolinit. Ko smo povečali koncentracijo koloida, je bil efekt še večji – tako pri bentonitu kot pri kaolinitu je prišlo do proporcionalnega znižanja hitrosti respiracije, kar pomeni, da je zaradi večje vezave hranil na koloidne manj dostopnih hranil v raztopini in posledično manjša produkcija CO₂. Podaljšanje predinkubacije koloidov v gojišču iz 1 ure na 24 ur je povečalo respiracijsko aktivnost bakterij, tako v gojišču s kaolinitom kot v gojišču z bentonitom. To je nepričakovan rezultat, saj smo pričakovali, da se bo med daljšo predinkubacijo koloidov

več hranil vezalo na koloide ter posledično manj hranil ostalo dostopnih bakterijam, zaradi česar bi bila hitrost respiracije manjša. Vzrokov za dobljene rezultate bi bilo lahko več. Med daljšo predinkubacijo koloidov bi lahko del vezanih hranil desorbiral s koloidov, tako da bi bilo več hranil dostopnih v raztopini kot pri 1-urni predinkubaciji koloidov in posledično večja hitrost respiracije. Glede na rezultate je razvidno, da je delež vezanih proteinov na koloidne delce enak ne glede na dolžino predinkubacije in torej ne more razložiti razlik v respiraciji. Možno je, da je poleg vezave hranil na koloide, prišlo tudi do pritrjanja bakterij na koloide in je le-to različno pri 1-urni in 24-urni predinkubaciji. Mnogi avtorji navajajo (ZoBell, 1943; Hattori R in Hattori T, 1963; Gordon in sod., 1983; Fletcher, 1986; Ayo in sod., 2001), da se aktivnost pritrjenih bakterij razlikuje od aktivnosti prosto plavajočih bakterij. Glede na dobljene rezultate lahko izključimo tudi to možnost, saj je v okviru napake delež pritrjenih bakterij na minerale glin enak ne glede na dolžino predinkubacije. Kljub relativno veliki eksperimentalni napaki, se kaže trend zmanjšanja adsorbiranih bakterij pri 24-urni predinkubaciji.

Iz eksperimentov je razvidno, da bakterije večinsko izrabljajo hranila v raztopini, hranila vezana na koloidih pa so nedostopna. To trditev podpira eksperiment, kjer smo koloide po predinkubaciji odstranili iz raztopine. Po odstranitvi koloidov z vezanimi hranili iz sistema je bila produkcija CO₂ sicer manjša v primerjavi z eksperimentom s prisotnimi koloidi ter nanje vezanimi hranili, vendar v okviru eksperimentalne napake ni bilo signifikantnih razlik. To kaže na to, da bakterije ne izkoriščajo vezanih hranil. Glavni efekt dodatka koloidov je torej odstranjevanje hranil iz raztopine. Rezultati naših raziskav kažejo, da imajo minerali glin, predvsem bentonit, velik vpliv na aktivnost bakterij, zaradi manjše dostopnosti hranil.

5.2 SKLEPI

Koloidi vplivajo na hitrost respiracije in rast bakterij – rast bakterij je slabša, zmanjša se nosilnost okolja ter hitrost rasti, prav tako je manjša hitrost respiracije.

Primerjalno ima večji vpliv na rast in aktivnost bakterijskih celic bentonit kot kaolinit.

V času ene ure se lahko na bentonit veže do 20 % vseh proteinov prisotnih v gojišču – štirikrat več kot na kaolinit.

Z višanjem koncentracije koloidov se hitrost respiracije bakterij zmanjša.

6 POVZETEK

Minerali glin predstavljajo večino koloidne frakcije v tleh, sedimentih in vodi, kjer so zelo pomembni, saj zaradi svojih fizikalno-kemijskih lastnosti lahko vplivajo na vezavo in s tem na pretok hranil v sistemu. Pomembni skupini mineralov glin sta montmorillonit in kaolinit, ki se razlikujeta po splošni kemijski formuli, strukturi in fizikalno-kemijskih lastnostih. Delci montmorillonita so v primerjavi s kaolinitom manjši, z veliko večjo površino ter kationsko izmenjevalno kapaciteto. V diplomski nalogi smo proučevali, kako bentonit (predstavnik montmorillonita) in kaolinit vplivata na rast in hitrost respiracije seva *Pseudoalteromonas* sp.. Rast smo spremljali spektrofotometrično in nato iz rastijskih krivulj matematično določili rastne parametre. Rast seva *Pseudoalteromonas* sp. je bila v primerjavi s kontrolo slabša v gojiščih, ki smo jih predinkubirali s koloidi. Največji vpliv je imel bentonit, saj je bila tu hitrost rasti najmanjša, prav tako je bila manjša nosilnost okolja, in sicer za več kot 70 %. Ugotovili smo, da se hranila vežejo na koloide že po 1 uri. Na bentonit se je vezal večji delež hranil (20 %) kot na kaolinit (5 %), kar je eden izmed možnih vzrokov za slabšo rast na bentonitu. Vpliv koloidov na hitrost respiracije seva *Pseudoalteromonas* sp. smo spremljali z merjenjem produkcije CO₂ v 1 uri. Hitrost respiracije je bila ob prisotnih koloidih manjša. Največji vpliv je imel zopet bentonit, kjer je bila hitrost respiracije najnižja. Ugotovili smo tudi, da se z večanjem koncentracije koloidov, hitrost respiracije manjša.

7 VIRI

- Allredge A.L., Gotschalk C.C. 1990. The relative contribution of marine snow of different origins to biological processes in coastal waters. *Continental Shelf Research*, 10, 1: 41-58
- Allredge A.L., Silver M.W. 1988. Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Progress in Oceanography*, 20, 1: 41-82
- Amon R.M.W., Benner R. 1994. Rapid cycling of high-molecular-weight dissolved organic matter in the ocean. *Nature*, 369: 549-552
- Anesio A.M., Abreu P.C., Biddanda B.A. 2003. The role of free and attached microorganisms in the decomposition of estuarine macrophyte detritus. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 56: 197-201
- Arnarson T.S., Keil R.G. 2005. Influence of organic-mineral aggregates on microbial degradation of dinoflagellate *Scrippsiella trochoide*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69, 8: 2111-2117
- Ayo B., Unanue M., Azúa I., Gorsky G., Turley C., Iriberry J. 2001. Kinetics of glucose and amino acid uptake by attached and free-living marine bacteria in oligotrophic waters. *Marine Biology*, 138: 1071-1076
- Bell C.R., Albright L.J. 1982. Attached and free-floating bacteria in a diverse selection of water bodies. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 6: 1227-1237
- Boehm P.D., Quinn J.G. 1973. Solubilization of hydrocarbons by the dissolved organic matter in the sea. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 37: 2459-2477
- Bonin P., Rontani J.F., Bordenave L. 2001. Metabolic differences between attached and free-living marine bacteria: inadequacy of liquid cultures for describing in situ bacterial activity. *FEMS Microbiology Letters*, 194: 111-119

- Bright J.J., Fletcher M. 1983. Amino acid assimilation and electron transport system activity in attached and free-living marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 3: 818-825
- Calvillo Y.M., Alexander M. 1996. Mechanism of microbial utilization of biphenyl sorbed to polyacrylic beads. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45: 383–390
- Conn H.J., Conn J.E. 1940. The stimulating effects of colloids upon the growth of certain bacteria. *Journal of Bacteriology*, 39: 99-100
- Dashman T., Stotzky G. 1982. Adsorption and binding of amino acids on homoionic montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 447-456
- Dashman T., Stotzky G. 1984. Adsorption and binding of peptides on homoionic montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology and Biochemistry*, 16: 51-55
- Dashman T., Stotzky G. 1986. Microbial utilization of amino acids and a peptide bound on homoionic montmorillonite and kaolinite. *Soil Biology and Biochemistry*, 18: 5-14
- Decho A.W. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review*, 28: 73-153
- Estermann E.F., McLaren A.D. 1959. Stimulation of bacterial proteolysis by adsorbents. *Journal of Soil Science*, 10: 64-78
- Fletcher M. 1986. Measurement of glucose utilization by *Pseudomonas fluorescens* that are free-living and that are attached to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 4: 672-676
- Golberg S.S., Gainey P.L. 1955. Role of surface phenomena in nitrification. *Soil Science*, 80: 43-49

Gordon A.S., Gerchakov S.M, Millero F.J. 1983. Effects of inorganic particles on metabolism by a periphytic marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 2: 411-417

Gordon A.S., Millero F.J. 1985. Adsorption mediated decrease in the biodegradation rate of organic compounds. *Microbial Ecology*, 11: 289-298

Grim R.E. 1968. *Clay mineralogy*. 2nd ed. New York, McGraw-Hill: 596 str.

Guerin W.F., Boyd S.A. 1992. Differential bioavailability of soilsorbed naphthalene to two bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1142–1152

Harwood J.H., Pirt S.J. 1972. Quantitative aspects of growth of the methane oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* on methane in shake flask and continuous chemostat culture. *Journal of Applied Bacteriology*, 35: 597-607

Hattori R., Hattori T. 1963. The effect of a liquid-solid interface on the life of microorganisms. *Ecological Review*, 16: 63-70

Heukelekian H., Heller A. 1940. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*, 40: 547-558

Jeffrey W.H., Paul J.H. 1986. Activity of an attached and free-living *Vibrio* sp. As measured by thymidine incorporation, *p*-iodonitrotetrazolium reduction, and ATP/DNA ratios. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 150-156

Jenny H. 1932. Studies on the mechanism of ionic exchange in colloidal aluminium silicates. *Journal of Physical Chemistry*, 36: 2217-2258

Koike I., Hara S., Terauchi K., Kogure K. 1990. Role of sub-micrometre particles in the ocean. *Nature*, 345: 242-244

- Kunc F., Stotzky G. 1970. Breakdown of some aldehydes in soils with different amounts of montmorillonite and kaolinite. *Folia Microbiologica*, 15: 216
- Lavie S., Stotzky G. 1986. Adhesion of the clay minerals montmorillonite, kaolinite, and attapulgite reduces respiration of *Histoplasma capsulatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 1: 65-73
- Luckham F., Rossi S. 1999. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 82: 43-92
- Manahan S.E. 2005. *Environmental chemistry*. 8th ed. Boca Raton, CRC Press: 783 str.
- Marshman N.A., Marshall K.C. 1981. Bacterial growth on proteins in the presence of clay minerals. *Soil Biology and Biochemistry*, 13: 127-134
- McCalla T.M. 1940a. Cation adsorption by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 40: 23-32
- McCalla T.M. 1940b. Physico-chemical behavior of soil bacteria in relation to the soil colloid. *Journal of Bacteriology*, 40: 33-43
- Nagata T., Kirchman D.L. 1996. Bacterial degradation of protein adsorbed to model submicron particles in seawater. *Marine Ecology Progress Series*, 132: 241-248
- Nagata T., Kirchman D.L. 1991. Release of dissolved free and combined amino acids by bacterivorous marine flagellates. *Limnology and Oceanography*, 36, 3: 433-443
- Nováková J. 1970. Effect of clay minerals on the mineralisation of peptone in liquid medium. *Folia Microbiologica*, 15: 217
- Ogram A.V., Jessup R.E., Ou L.T., Rao P.S.C. 1985. Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid in soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 582-587

- O'Loughlin E.J., Traina S.J., Sims G.K. 2000. Effects of sorption on the biodegradation of 2-methylpyridine in aqueous suspensions of reference clay minerals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 9: 2168-2174
- Posch T., Arndt H. 1996. Uptake of sub-micrometre and micrometre-sized detrital particles by bacterivorous and omnivorous ciliates. *Aquatic Microbial Ecology*, 10: 45-53
- Proctor L.M., Fuhrman J.A. 1990. Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature*, 343: 60-62
- Robinson K.G., Farmer W.S., Novak J.T. 1990. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Water Research*, 24: 345-350
- Satterberg J., Arnarson T.S., Lessard E.J., Keil R.G. 2003. Sorption of organic matter from four phytoplankton species to montmorillonite, chlorite and kaolinite in seawater. *Marine Chemistry*, 81: 11-18
- Shanks A.L., Walters K. 1997. Holoplankton, meroplankton, and meiofauna associated with marine snow. *Marine Ecology Progress Series*, 156: 75-86
- Shibata A., Kogure K., Koike I., Ohwada K. 1997. Formation of submicron colloidal particles from marine bacteria by viral infection. *Marine Ecology Progress Series*, 155: 303-307
- Sholkovitz E.R. 1976. Flocculation of dissolved organic and inorganic matter during the mixing of river water and seawater. *Geochemica et Cosmochimica Acta*, 40: 831-845
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85

- Smith D.C., Simon M., Alldredge A.L., Azam F. 1992. Intense hydrolytic enzyme activity of marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*, 359: 139-142
- Stark W.H., Stadler J., McCoy E. 1938. Some factors affecting the bacterial populations of freshwater lakes. *Journal of Bacteriology*, 36: 653-654
- Stotzky G. 1972. Activity, ecology, and population dynamics of microorganisms in soil. *Critical Reviews in Microbiology*, 2: 59-126
- Stotzky G., Rem L.T. 1966. Influence on clay minerals on microorganisms. I. Montmorillonite and kaolinite on bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 12: 547-563
- Tang W.C., White J.C., Alexander M. 1998. Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49: 117-121
- Van Loosdrecht M.C.M., Lyklema J., Norde W., Zehnder A.J.B. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, 54, 1: 75-87
- Waksman S.A., Reuszer H.W., Carey C.L., Hotchkiss M., Renn C.E. 1933. Studies on the biology and chemistry of the Gulf of Maine. III. Bacteriological investigations of the sea water and marine bottoms. *Biological Bulletin*, 64: 183-205
- Wells M.L., Goldberg E.D. 1991. Occurrence of small colloids in sea water. *Nature*, 353: 342-344
- Wells M.L., Goldberg E.D. 1992. Marine submicron particles. *Marine Chemistry*, 40: 5-18
- Wells M.L., Goldberg E.D. 1993. Colloid aggregation in sea-water. *Marine Chemistry*, 41: 353-358

Fajfar N. Vpliv vrste in koncentracije koloidov na aktivnost bakterij.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2006

Wenk H.R., Bulakh A. 2004. Minerals. Their constitution and origin. New York, Cambridge University Press: 646 str.

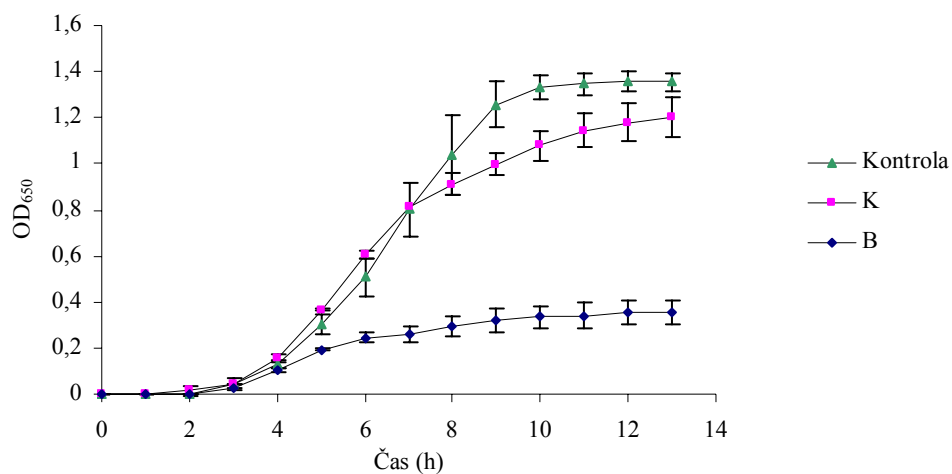
Wszolek P.C., Alexander M. 1979. Effect of desorption rate on the biodegradation of n-alkylamines bound to clay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 27, 2: 410-414

ZoBell C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46: 39-56

ZoBell C.E., Anderson Q. 1936. Observations on multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biological Bulletin*, 71: 324-342

Priloga A

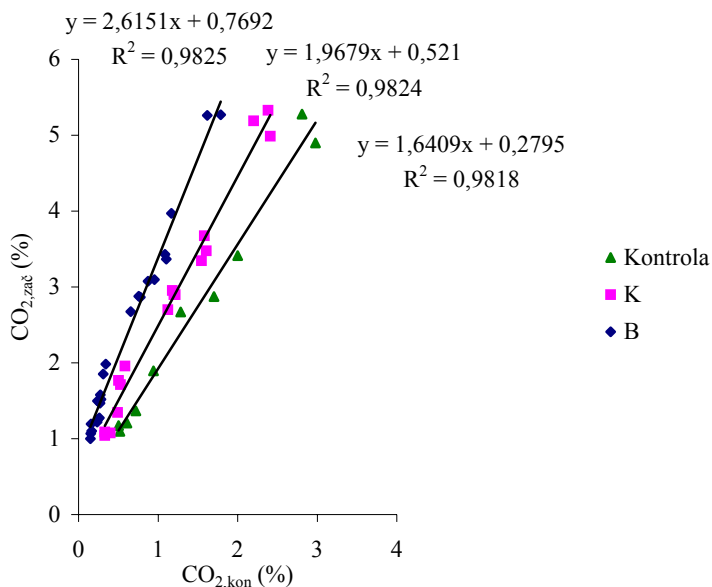
Rastne krivulje



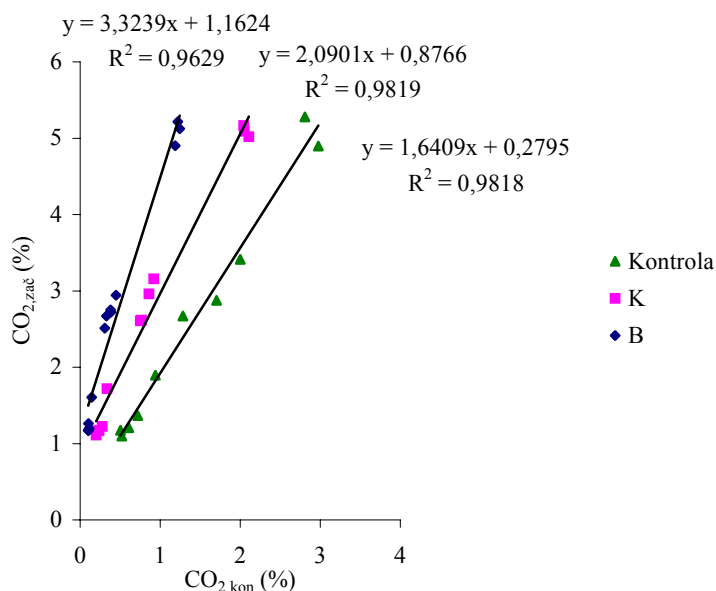
Priloga A: Rast seva *Pseudoalteromonas* sp. v različnih tekočih gojiščih: Kontrola - gojišče PKS, K - gojišče PKS predinkubirano s kaolinitom, B - gojišče PKS predinkubirano z bentonitom. Čas predinkubacije gojišča s koloidi je bil 24 ur. Rezultati so prikazani kot povprečja \pm standardni odkloni ($n = 3$).

Priloga B

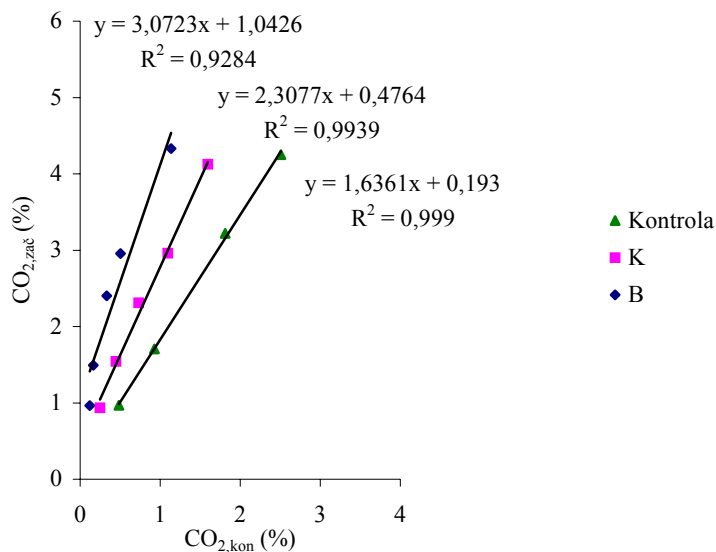
Umeritvene krivulje



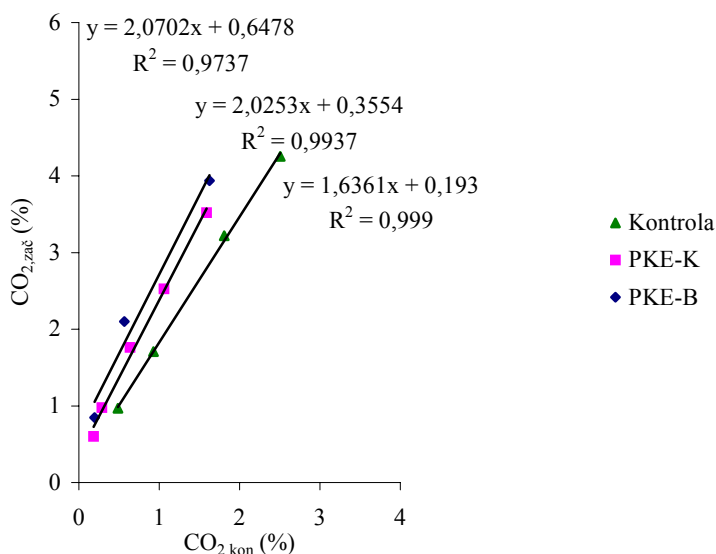
Priloga B1: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO₂ v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS s kaolinitom (K) in v gojišču PKS z bentonitom (B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,008 g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 1 uro.



Priloga B2: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO₂ v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS s kaolinitom (K) in v gojišču PKS z bentonitom (B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,04 g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 1 uro.



Priloga B3: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO_2 v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS s kaolinitom (K) in v gojišču PKS z bentonitom (B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,04g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 24 ur.



Priloga B4: Umeritvene krivulje: raztapljanje CO_2 v različnih gojiščih – v gojišču PKS brez koloidov (Kontrola), v gojišču PKS z odstranjenim kaolinitom (PKE-K) in v gojišču PKS z odstranjenim bentonitom (PKE-B). Koncentracije posameznih koloidov v gojišču so bile 0,04g/mL, čas predinkubacije gojišč s koloidi je bil 24 ur.