

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara MUŠCET

**ODPORNOST BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V PREBAVILIH RAKA
PORCELLIO SCABER (CRUSTACEA: ISOPODA) PROTI ŽIVEMU
SREBRU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Barbara MUŠČET

**ODPORNOST BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V PREBAVILIH RAKA
PORCELLIO SCABER (CRUSTACEA: ISOPODA) PROTI ŽIVEMU
SREBRU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**RESISTANCE OF BACTERIAL COMMUNITY IN THE GUTS OF
ISOPOD *PORCELLIO SCABER* AGAINST MERCURY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

POPRAVKI

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov ter na Katedri za splošno zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde Cimerman, za somentorico prof. dr. Damjano Drobne in za recenzentko prof. dr. Jasno Štrus.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde Cimerman

Somentorica: prof. dr. Damjana Drobne

Recenzentka: prof. dr. Jasna Štrus

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor Nekrep
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Članica: prof. dr. Damjana Drobne
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Barbara Muščet

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.22 +579.26 : 546.49 :595.3.05(043) =863
KG ekotoksikologija / črevesna bakterijska združba / rak enakonožec / *Porcellio scaber* / živo srebro / izpostavljenost živemu srebru / odpornost bakterij proti živemu srebru / prilagoditev bakterij na živo srebro / TTGE / 16S rDNK / CFU
AV MUŠČET, Barbara
SA GUNDE CIMERMAN, Nina (mentorica) / DROBNE, Damjana (somentorica) / ŠTRUS, Jasna (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2006
IN ODPORNOST BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V PREBAVILIH RAKA *PORCELLIO SCABER* (CRUSTACEA: ISOPODA) PROTI ŽIVEMU SREBRU
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP XI, 61 str., 5 pregl., 16 sl., 3 pril., 86 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Preučevali smo vpliv kratkotrajne izpostavljenosti živemu srebru na (1) spremembo črevesne bakterijske združbe kopenskih rakov enakonožcev *Porcellio scaber* in (2) odziv živali na podlagi prehranjevalnih razlik. Zaradi tesne povezave gostitelja in črevesne mikrobne združbe, ima lahko sprememba združbe, kot posledica vnosa kovin, vpliv tudi na fiziološke procese v živali. Zaradi tega smo preučevali vplive onesnaženja z živim srebrrom na bakterijsko združbo čreves rakov enakonožcev. Rake smo nabrali v Idriji, na področju z visokimi koncentracijami živega srebra in v Radleku, kjer so koncentracije živega srebra nizke. Po 14-dnevem laboratorijskem poskusu akutne izpostavljenosti živemu srebru (v koncentraciji 10 µg Hg/g suhe teže hrane) smo z molekularnimi in gojitvenimi metodami ugotavljali vpliv živega srebra na črevesno mikrobno združbo živali iz obeh okolij. S profiliranjem genov za 16S rDNK s temperaturno gradientno gelsko elektroforezo (TTGE) smo pokazali razlike med sestavo mikrobnih združb čreves živali iz obeh okolij. Število kulturabilnih bakterij odpornih na živo srebro je bilo povečano pri združbi živali iz onesnaženega kraja. Izpostavitev rakov enakonožcev je bila prekratka, da bi bil z gojitvenimi tehnikami viden izrazit porast deleža bakterij, odpornih proti živemu srebru, pri predhodno neprilagojeni mikrobni združbi. Pri predhodno prilagojeni mikrobni združbi čreves živali iz Idrije pa se je delež bakterij odpornih na živo srebro po izpostavitvi povečal. Z metodo TTGE profiliranja 16S rDNK smo po koncu prehranjevalnega poskusa pri izpostavljeni skupini iz okolja neonesnaženega z živim srebrrom, zaznali nove fragmente. Predvidevamo, da pripadajo skupini bakterij odpornih na živo srebro, ki jih sčasoma prerastejo druge bakterije odporne na živo srebro.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22 +579.26 : 546.49 :595.3.05(043) =863
CX ecotoxicology / bacterial gut microflora / isopods /*Porcellio scaber* / mercury / exposure to mercury / bacterial resistance to mercury / bacterial adaptation to mercury / TTGE / 16S rDNA / CFU
AU MUŠČET, Barbara
AA GUNDE CIMERMAN, Nina (supervisor) / DROBNE, Damjana (co- advisor) / ŠTRUS, Jasna (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2006
TI RESISTANCE OF BACTERIAL COMMUNITY IN THE GUTS OF ISOPOD
PORCELLIO SCABER AGAINST MERCURY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 61 p., 5 tab., 16 fig., 3 ann., 86 ref.
LA sl
AL sl / en
AB We investigated the effect of the short-term mercury pollution on (1) the bacterial gut microflora of the isopod *Porcellio scaber* and (2) feeding response of the isopods. Isopod-gut bacterial microflora interactions are very important, so the changes in microbial community could also affect isopods' physiology. That's why this organism was used in our experiment. Isopods were collected in Idrija in the areas chronically polluted with mercury and in Radlek in areas, with no previous reports on industrial activities. After 14-days of experimental exposure to mercury (10 µg Hg/g dry weight of food) we investigated the community level bacterial response with use of molecular and culturable methods. The results of temporal temperature gel electrophoresis (TTGE) 16S rDNA profiling showed diversity of profiles between samples from both environments. The culturable approach showed the highest proportion of Hg-resistant bacteria in the gut of the animals taken from chronically polluted environment as opposed to the gut of the animals from Radlek. After 14-days of mercury exposure, culturable method did not show significant increase in Hg-resistant bacteria in samples taken in Radlek. In the previously adapted microbial communities from the guts of animals collected in Idrija the increase of Hg-resistant phenotypes were observed. We speculate that a period of 14 days is too short for acquiring and spreading resistance to mercury in the microbial community, which can be detected by culturable method. TTGE 16S rDNA profiling showed new groups of bacteria in samples taken from unpolluted environment. We speculate, that this bacteria are Hg-resistant, but after additional time they become overgrown by other resistant bacteria.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ŽIVO SREBRO V NARAVI	2
2.1.1 Kroženje živega srebra	2
2.1.2 Mikrobne transformacije živega srebra	3
2.1.2.1 Metilacija živega srebra	3
2.1.2.2 Demetilacija živega srebra	4
2.1.2.3 Redukcija živega srebra	4
2.1.2.4 Oksidacija živega srebra	5
2.2 VPLIV ŽIVEGA SREBRA NA ORGANIZME	6
2.2.1 Vpliv živega srebra na celičnem nivoju	6
2.2.1.1 Odpornost proti živemu srebru s pomočjo mer operona	7
2.2.2 Vpliv živega srebra na bakterijske združbe	9
2.2.2.1 Vpliv kratkotrajne izpostavitve živemu srebru na bakterijsko združbo ..	10
2.2.2.2 Vpliv dolgotrajne izpostavitve živemu srebru na bakterijsko združbo ..	10
2.2.3 Živo srebro in interakcije z višjimi organizmi	11
2.3 ŽIVO SREBRO V SLOVENIJI	12
2.4 PREBAVILO KOT MIKROBNI EKOSISTEM	13
2.4.1 Vloga bakterijske združbe v prebavilu gostitelja	13
2.4.2 Vloga kopenskih rakov enakonožcev v ekotoksikologiji	13
2.4.3 Mikroorganizmi v prebavilu <i>P. scaber</i>	14
2.5 DOLOČANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB	17
2.5.1 Kulturabilne tehnike	17
2.5.2 Molekularne tehnike	17
2.5.2.1 Gradientne elektroforeze	20
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 METODE	21
3.1.1 Vzorčenje	21
3.1.2 Prehranjevalni poskus	21
3.1.3 Molekularne tehnike	23
3.1.4 Določanje števila bakterij odpornih proti živemu srebru in celokupnega števila kulturabilnih bakterij z metodo CFU	28
3.2 MATERIALI	29
3.2.1 Izolacija DNK	29
3.2.2 Čiščenje DNK	30

3.2.3	Agarozna gelska elektroforeza	30
3.2.4	TTGE	30
3.2.5	Hranilni agar (NA).....	31
3.3	KEMIKAJIJE	31
4	REZULTATI	32
4.1	PREHRANJEVALNI POSKUS Z ŽIVIM SREBROM.....	32
4.2	RAZNOLIKOST BAKTERIJSKIH POPULACIJ, DOLOČENA Z METODO TTGE.....	36
4.3	ŠTEVILO KULTURABILNIH HETEROTROFNIH BAKTERIJ DOLOČENO Z METODO CFU.....	39
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	44
5.1	RAZPRAVA	44
5.1.1	Prehranjevalni poskus z živim srebrom	44
5.1.2	Raznolikost bakterijskih populacij določena z metodo TTGE	45
5.1.3	Število kulturabilnih heterotrofnih bakterij določeno z metodo CFU	47
5.2	SKLEPI.....	50
6	POVZETEK	51
6	SUMMARY	53
7	VIRI	55
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 2.1. Mikrobne transformacije živega srebra (Oremland in sod., 1991; Robinson in Tuovinen, 1984; Barkay in sod., 2003; Lizama in Sankey, 1993)	5
Preglednica 2.2. Proteini <i>mer</i> operona in njihova funkcija	8
Preglednica 2.3. Bakterije, ki so bile opisane v prebavilih <i>P. scaber</i> (Lapanje, 2005; Kostanjšek in sod., 2002; Jorgensen in sod., 1997; Zimmer in Topp, 1998; Lapanje in sod., 2000; Wood in Griffiths, 1998; Wang in sod., 2004)	16
Preglednica 4.1. Stopnja preživetja posameznih skupin živali <i>P. scaber</i> med prehranjevalnim poskusom	32
Preglednica 4.2. Primerjava vrednosti CFU iz polnih in praznih čreves <i>P. scaber</i> nabrani na Radleku in v Idriji pred in po spomladanskem prehranjevalnim poskusom (K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, NA – trdna gojišča brez Hg, NAHg – trdna gojišča z Hg, IK – Idrija kontrolna skupina, RK – Radlek kontrolna skupina)	41

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 2.1. Mehanizem odpornosti proti živemu srebru v po Gramu negativnih bakterijah s produkti genov <i>mer</i> operona	8
Slika 3.1. Shema jesenskega in spomladanskega prehranjevalnega poskusa	22
Slika 3.2. Shema molekularnih tehnik uporabljenih pri vzorcih polnih in praznih čreves pri jesenskih živalih <i>P. scaber</i>	26
Slika 3.3. Shema določanja CFU polnih in praznih čreves spomladanskih živali <i>P. scaber</i>	29
Slika 4.1. Povprečne teže nabranih živali vrste <i>P. scaber</i> v različnih vzorčevalnih lokacijah in časih (RK – Radlek kontrolna skupina, RHg – Radlek izpostavljena skupina, IK – Idrija kontrolna skupina, IHg – Idrija izpostavljena skupina)	33
Slika 4.2. Število izločenih iztrebkov na vzorčni interval na žival <i>P. scaber</i> iz Radleka in Idrije tekom 15 dnevnega jesenskega prehranjevalnega poskusa (RK – Radlek kontrola, RHg – Radlek Hg izpostavljena skupina, IK – Idrija kontrola, IHg – Idrija Hg izpostavljena skupina). Odkloni prikazujejo vrednosti standardne napake.	34
Slika 4.3. Trend upada števila izločenih iztrebkov na žival v jesenskem prehranjevalnem poskusu, vrednosti so dobljene z linearno regresijo	35
Slika 4.4. Število izločenih iztrebkov na vzorčni interval živali <i>P. scaber</i> iz Radleka in Idrije tekom 15 dnevnega spomladanskega prehranjevalnega poskusa (RK – Radlek kontrola, RHg – Radlek Hg izpostavljena skupina, IK – Idrija kontrola, IHg – Idrija Hg izpostavljena skupina)	36
Slika 4.5. TTGE profil bakterijskih združb v črevesih in iztrebkih <i>P. scaber</i> med 15 dnevnim jesenskim prehranjevalnim poskusom (I – Idrija, R – Radlek, E – prazno črevo, F – polno črevo, K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, FF – iztrebki po 2. dnevu, FM – iztrebki po 6. dnevu, FL – iztrebki po 14. dnevu)	37
Slika 4.6. UPGMA dendrogram TTGE profilov bakterijskih združb polnih, praznih čreves in fecesov <i>P. scaber</i> (I – Idrija, R – Radlek, E – prazno črevo, F – polno črevo, K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, FF – iztrebki po 2.dnevu, FM – iztrebki po 6.dnevu, FL – iztrebki po 14.dnevu)	38
Slika 4.7. UPGMA dendrogram TTGE profilov bakterijskih združb praznih čreves <i>P. scaber</i> (IEK – Idrija prazno črevo izpostavljena skupina, IEK – Idrija prazno črevo kontrolna skupina, REHg – Radlek prazno črevo izpostavljena skupina,	39

	REK – Radlek prazno črevo kontrolna skupina)	
Slika 4.8.	UPGMA dendrogram TTGE profilov bakterijskih združb iztrebkov <i>P. scaber</i> iz Radleka in Idrije po 2., 6., in 14.dnevu prehranjvalnega poskusa (I – Idrija, R – Radlek, K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, FF – iztrebki po 2.dnevu, FM – iztrebki po 6.dnevu, FL – iztrebki po 14.dnevu)	39
Slika 4.9.	Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves <i>P. scaber</i> kontrolnih in izpostavljenih skupin iz onesnaženega okolja (Idrija) na ploščah brez Hg (NA) po dnevih inkubacije plošč	42
Slika 4.10.	Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves <i>P. scaber</i> kontrolnih in izpostavljenih skupin iz onesnaženega okolja (Idrija) na ploščah z Hg (NAHg) po dnevih inkubacije plošč	42
Slika 4.11.	Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves <i>P. scaber</i> kontrolnih in izpostavljenih skupin iz neonesnaženega okolja (Radlek) na ploščah brez Hg (NA) po dnevih inkubacije plošč	43
Slika 4.12.	Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves <i>P. scaber</i> kontrolnih in izpostavljenih skupin iz neonesnaženega okolja (Radlek) na ploščah z Hg (NAHg) po dnevih inkubacije plošč	43

KAZALO PRILOG

- Priloga A Prikaz deleža bakterijskih skupin v klonskih knjižnicah iz DNK praznih čreves *P. scaber* nabranih na Radleku (neonesnaženo okolje) in v Idriji (onesnaženo okolje). Z rdečo so prikazane skupine, ki se povečajo v onesnaženem kraju in z modro tiste, ki se zmanjšajo (Lapanje, 2005)
- Priloga B Prikaz deležev bakterijskih skupin Hg tolerantnih bakterijskih izolatov iz čreves *P. scaber* nabranih na Radleku in Idriji (Lapanje, 2005)
- Priloga C Ocena bogatosti vrst v vzorcih praznih čreves živali *P. scaber* nabranih v Idriji in Radleku (Lapanje, 2005)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S rRNK	ribosomski 16S RNK geni
CFU	metoda določanja števila kolonij na trdnih gojiščih
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid
FAME	identifikacijska metoda na osnovi maščobnih kislin
OTE	opažene taksonomske enote
PCR	verižna reakcija s polimerazo <i>Taq</i>
PLFA	identifikacijska metoda na osnovi fosfolipidov
RFLP	polimorfizem restrikcijskih fragmentov
RNK	ribonukleinska kislina
SDS	natrijev dodecil sulfat
SRB	sulfat-reducirajoče bakterije
TTGE	temperaturna gradientna gelska elektroforeza

1 UVOD

Živo srebro (Hg) je kovina, ki je že v nizkih koncentracijah toksična za žive organizme (Boening, 2000). Bakterije so se na toksičnost živega srebra prilagodile in razvile posebne mehanizme odpornosti. Zato mikroorganizmi, z biološko transformacijo med različnimi oksidativnimi stanji živega srebra, pomembno vplivajo na kroženje Hg in lahko zmanjšajo ali povečajo njegovo toksičnost za večcelične organizme (Barkay in sod., 2003).

Prebavilo živali ima specifično indigeno mikrobno združbo, ki je prilagojena na okolje v katerem živi. Kopenski rak enakonožec in njegova črevesna mikroflora sta tesno povezana, saj mikrobi pomembno sodelujejo pri učinkoviti razgradnji rastlinskega materiala (Dillon in Dillon, 2004; Hopkin, 1989). Encimi za razgradnjo celuloze, hemiceluloze in lignina so lahko namreč indigenega ali bakterijskega izvora (Hartenstein, 1964; Kostanjšek in sod., 2002). Obremenitev s kovino lahko združbo mikroorganizmov spremeni, kar se odraža v spremenjenih fizioloških procesih v živali. Spremenjena mikrobna združba prebavil lahko vpliva na mineralizacijo organskega materiala in posledično na kroženje snovi v naravi. Kopenski rak enakonožec je sposoben preživeti v okolju s povišanimi koncentracijami kovin. Zato je dober modelni organizem za raziskave vpliva kovin na živali na različnih bioloških nivojih (Hopkin, 1989; Drobne, 1997).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil primerjati spremembo strukture mikrobne združbe v črevesih živali, po 14-dnevni laboratorijski izpostavitvi 10 µg Hg/g suhe teže hrane. Živali so bile nabrane v neonesnaženem okolju in okolju kronično onesnaženim z živim srebrom. Strukturo združbe smo določevali z molekularnimi in gojitvenimi tehnikami. Pričakovali smo, da je mikrobna združba živali iz kronično onesnaženega okolja že prilagojena na živo srebro in se po izpostavitvi ne bo bistveno spremenila. Pri živalih iz neonesnaženega okolja pa mikrobna združba na kovino še ni prilagojena, zato bo izpostavitve živemu srebru vplivala na spremembo strukture.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ŽIVO SREBRO V NARAVI

2.1.1 Kroženje živega srebra

Živo srebro (Hg) je kovina, svetleče se srebrne barve z vrstnim številom 80 v periodnem sistemu in molsko maso 200,59 g/mol. Je edina kovina, ki je v čisti obliki tekoča; pri normalni temperaturi ima Henrijev koeficient 0,3. Toksišnost Hg za organizme je odvisna od njegove biološke dostopnosti. Živo srebro je v okolju najbolj pogosto v obliki slabo vodotopnega minerala cinabarita (HgS ; topnost 10^{-6} g/100 ml vode) (Weast, 1989; Barkay in sod., 2003). Sulfat reducirajoče bakterije (v nadaljevanju SRB) producirajo H_2S , ki spontano reagira z živim srebrom po reakciji $\text{H}_2\text{S} + \text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{HgS}$. Zaradi slabe topnosti HgS , je tako živo srebro odstranjeno iz kroženja, s tem pa tudi slabše biološko dostopno. V anaerobnih sedimentih je večina živega srebra v tej obliki. Ostale oblike živega srebra (Hg^0 , Hg^{2+} , metil-Hg (Met-Hg), dimetil-Hg (Met-Hg-Met)) so topne in s tem dostopne za biološko transformacijo med različnimi oksidativnimi stanji (Madigan in sod., 2003). V atmosferi je živo srebro pretežno v obliki Hg^0 , ki je hlapen; fotokemijsko se lahko oksidira do Hg^{2+} , ki s padavinami zopet pade na površino. Večina živega srebra, ki vstopa v vodna okolja je zato v obliki iona (Barkay in sod., 2003).

Vulkanski izbruhi, izhlapevanje Hg iz zemlje bogate z živim srebrom in mikrobn mobilizacija Hg, ki se nahaja v sedimentih rek in oceanov, predstavljajo naravni način vnosa živega srebra v okolje. Vnos Hg iz podzemnih, slabo dostopnih rezervoarjev na površino je v veliki meri pospešil človek z izgorevanjem fosilnih goriv, rudarjenjem, odlaganjem odpadkov (baterije, rabljene elektrode, zobozdravstvo...) ali z uporabo Hg v kmetijstvu (pogosto uporabljen v fungicidih). Antropogeni vir Hg predstavlja kar 75 % globalnega vnosa Hg v okolje in biosfero (Boening, 2000; Barkay in sod., 2003). Kroženje Hg iz površine (zemlja, vode) v atmosfero in nazaj, omogočajo biotski in abiotski procesi. Nekateri mikroorganizmi so razvili mehanizme odpornosti na živo srebro, ki temeljijo na

transformacijah Hg (metilacija Hg^{2+} , demetilacija CH_3Hg^+ (Met-Hg), redukcija Hg^{2+} in oksidacija Hg^0). Zato imajo ti mikroorganizmi pri kroženju živega srebra zelo pomembno vlogo (Barkay in sod., 2003).

2.1.2 Mikrobne transformacije živega srebra

2.1.2.1 Metilacija živega srebra

Mikrobi lahko metilirajo veliko kovin. Metilirana kovina je lipofilna, zato metilacija običajno poveča toksičnost kovine za večcelične organizme, saj omogoča njeno bioakumulacijo. Mikrobi metilirajo Hg^{2+} tako, da nastane Met-Hg. Donor metilne skupine so metilkorinoidi (analogi vitamina B₁₂). Bakterijska metilacija poteka najbolj intenzivno v anaerobnih sedimentih, kjer 95 % metilacije opravijo sulfat-reducirajoče bakterije. V optimalnih pogojih se metilira le okoli 3 % dostopnega Hg (Barkay in sod., 2003; Pak in Bartha 1998A; Pak in Bartha 1998B). Dokaz za povezavo sulfatne respiracije in metilacije Hg, je inhibicija sulfatne redukcije in upad tvorbe metil-Hg po dodatku molibdena (specifičen inhibitor sulfatne respiracije) v gojišča s SRB (King in sod., 1999; Compeau in Bartha, 1985). Dodaten dokaz za povezavo med sulfatno respiratorno aktivnostjo SRB in metilacijo Hg, je nezmožnost čiste kulture SRB za metilacijo Hg, če v gojišču ni prisotnega sulfata (Pak in Bartha, 1998B).

Z združitvijo dveh met-Hg s sulfidom, ki nastaja pri sulfatni respiraciji, nastane netopen precipitat dimetil-HgS [$(\text{CH}_3\text{Hg})_2\text{S}$], ki se deponira izven SRB celice. Z znižanjem pH se ta molekula razgradi na dimetil-Hg in HgS. Dimetil-Hg je zelo hlapen in izhaja iz neposredne okolice SRB celice. Razen tega se lahko dimetil-HgS spremeni v metil-Hg in HgS, ki se tudi precipitira v okolici celic. Pri zadnji reakciji nastajajo tudi manjše količine metana (Baldi in sod., 1993). Baldi in sod. (1993) so pokazali, da je Met-Hg desetkrat manj toksičen za sulfat-reducirajočo bakterijo *Desulfovibrio desulfuricans*, kakor za aerobni Hg-odporni sev *Pseudomonas putida* z *mer* operonom (poglavje 2.2.1.1). Znano je, da lahko *P. putida* s Hg-reduktazno aktivnostjo, kodirano na *mer* operonu, popolnoma razgradi 1 μg

Met-Hg do metana in Hg^0 v dveh urah. Dimetil-Hg je napolarna molekula, ki pasivno difundira hitreje kakor Hg^0 . Tega producirajo Hg-rezistentne bakterije z *mer* operonom. Od tod tudi manjša toksičnost Met-Hg za SRB. Metilacija Hg sicer poveča toksičnost za večcelične organizme, a je to za bakterije lahko domnevno eden od potencialnih mehanizmov za detoksifikacijo Hg (Compeau in Bartha, 1985; Baldi in sod., 1993)

2.1.2.2 Demetilacija živega srebra

Demetilacijo Met-Hg lahko vršijo bakterije, ki imajo *mer* operon, na katerem je zapis za encim liazo. Liaza cepi vez med ogljikom iz metilne skupine in Hg tako, da nastane metan in Hg^{2+} . Encim Hg-reduktaza reducira nastali Hg^{2+} v inerten in hlapen Hg^0 . Ta pot večinoma poteka v aerobnih okoljih (Robinson in Tuovinen, 1984).

V anaerobnih okoljih vršijo demetilacijo metanogene in sulfat reducirajoče bakterije. Uporabljajo lahko metil-Hg. Pri tem producirajo v večji meri CO_2 s sledovi metana in Hg^0 kot stranski produkt (Barkay in sod., 2003; Oremland in sod., 1991).

Okoljski nivo Met-Hg je odvisen od ravnotežja med bakterijsko metilacijo in demetilacijo, na katerega pa vplivajo redoks potencial, pH, tip prsti, organski material, prisotnost mikrobnih inhibitorjev (Boening, 2000). Mikroorganizmi so prvi člen v vodni prehranjevalni verigi, kjer se Met-Hg akumulira. Ko mikrobi sprostijo Met-Hg, ta vstopa v prehranjevalno verigo (zaradi hitre difuzije in močne vezave na proteine). Preko planktona, herbivorov in najvišjih predatorjev rib akumulirana količina Hg po prehranjevalni verigi narašča. Podobno velja za kopenska okolja (Barkay in sod., 2003; Boening, 2000; Clarkson, 2002).

2.1.2.3 Redukcija živega srebra

Biološka redukcija pomembno prispeva k prenosu Hg iz vodnih okolij v atmosfero. Poleg tega ima pomembno vlogo pri zmanjšanju Hg v sedimentih, kjer poteka metilacija (Barkay in sod., 2003). Biološko redukcijo vršijo bakterije, ki vsebujejo rezistenčno determinanto *mer* operon. Te reducirajo Hg^{2+} v Hg^0 . Poleg bakterij lahko nekatere alge reducirajo Hg^{2+}

s posebnim mehanizmom, ki je odvisen ali neodvisen od svetlobe. Nastali Hg° je slabo topen v vodi (60 $\mu\text{g/l}$ vode pri 25 $^{\circ}\text{C}$), a dobro hlapen (Weast, 1989). Zato takšna transformacija zmanjša toksičnost Hg za organizme.

2.1.2.4 Oksidacija živega srebra

Oksidacija Hg je najmanj preučevana transformacija pri kroženju živega srebra. Smith in sod., (1998) so pokazali, da bakterijski encimi hidroperoksidaze lahko oksidirajo hlapni Hg° v topen in biološko dostopen Hg^{2+} . Oksidacijo lahko vršijo tudi rastlinske in živalske katalaze. V aerobnih razmerah poteka oksidacija slabo topnega HgS zlasti s pomočjo bakterij iz rodu *Thiobacillus*, kar vodi v nastanek Hg^{2+} in s tem vračanje Hg v kroženje (Madigan in sod., 2003; Lizama in Sankey, 1993).

S transformacijami živega srebra lahko torej mikroorganizmi zmanjšajo ali povečajo toksičnost za večcelične organizme (preglednica 2.1.)

Preglednica 2.1.: Mikrobne transformacije živega srebra

Zmanjšanje toksičnosti za večcelične organizme	Mikroorganizmi	Mehanizem delovanja	Reakcija	Viri
	metanogene bakterije, SRB	odstranitev Met-Hg in vračanje Hg° v okolje	$\text{CH}_3\text{Hg}^+ \rightarrow \text{CO}_2 + \text{CH}_4 + \text{Hg}^{\circ}$	Oremland in sod., 1991; Robinson in Tuovinen., 1984
	bakterije z <i>mer</i> operonom	redukcija Hg^{2+} v Hg°	$\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^{\circ} + 2\text{e}^-$	Barkay in sod., 2003
	SRB	pomagajo pri odstranitvi Hg iz kroženja	$\text{H}_2\text{S} + \text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{HgS}$	Barkay in sod., 2003
Povečanje toksičnosti za večcelične organizme	<i>Thiobacillus</i> sp.	oksidacija HgS v aerobnem okolju	$\text{HgS} \rightarrow \text{H}_2\text{S} + \text{Hg}^{2+}$	Lizama in Sankey, 1993
	SRB in drugi mikroorganizmi*	metilacija živega srebra	$\text{Hg}^{2+} + \text{CH}_3^- \rightarrow \text{CH}_3\text{Hg}^+$	Barkay in sod., 2003

* metilacijo večinoma vršijo SRB

2.2 VPLIV ŽIVEGA SREBRA NA ORGANIZME

2.2.1 Vpliv živega srebra na celičnem nivoju

Nekatere kovine (kobalt, cink, železo) so v nizkih koncentracijah esencialne za celico, torej nujno potrebne za delovanje celičnih procesov; nekatere so toksične že v nizkih koncentracijah (živo srebro, arzen, kadmij). Bakterijski kromosomi imajo zapise za proteine, ki omogočajo privzem, koncentriranje, shranjevanje in izločanje esencialnih kationov in anionov (K^+ , Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} ...). Enaki mehanizmi obstajajo za potencialno toksične kovinske ione (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} ...), ki tako vstopijo v celico (Silver, 1998). Bakterijski mobilni elementi kodirajo sisteme za odpornost proti toksičnim kovinam. Večina sistemov bakterijske odpornosti temelji na aktivnem izčrpavanju toksičnih ionov iz celice. Silver (1996) predvideva, da je energijsko potratno imeti v vseh predstavnikih populacije visoko specializirane transportne sisteme za esencialne kovine, s katerimi toksični kovinski ioni ne bi interferirali. Za celotno populacijo je ugodneje imeti le nekaj celic s transporterji, ki nudijo odpornost na težke kovine. Ko je to potrebno, se ta genetska determinanta prenese na druge celice v populaciji. Organske oblike in nevodotopno Hg lahko zaradi dobre topnosti v lipidih, vstopajo v celico tudi pasivno. Bakterije z *mer* operonom imajo poseben mehanizem transmembranskih proteinov, preko katerega živo srebro selektivno prehaja. Živo srebro nato v celici reagira z Mer proteini, kar zmanjša njegovo toksičnost (Barkay in sod., 2003).

Tarča kovin so večinoma biomolekule. Kovine blokirajo ali izrinejo esencialne skupine biomolekul, modificirajo aktivne konformacije biomolekul, vplivajo na transport snovi skozi membrano ali se vežejo na druge esencialne kovine v celici. Živo srebro je toksično predvsem zaradi visoke afinitete do tiolnih skupin, visoke tendence do tvorbe vezi z organskimi molekulami ter njihove dolgotrajne stabilnosti. Tarča Hg so zato zlasti proteini, bogati z cisteini. Z destabilizacijo strukture inaktivirajo encime, kar vpliva na biokemijske reakcije v celici in na tvorbo energije. Živo srebro tako kot ostale težke kovine povzroča tudi oksidativni stres, s produkcijo prostih radikalov. Negativni učinki na bakterije se

kažejo v spremenjeni celični morfologiji, zaviranju rasti in celični smrti (Barkay in sod, 2003; Duxbury, 1985).

Poleg aktivnega izčrpavanja Hg iz celic s specifičnimi črpalkami in kemijske transformacije Hg (metilacija, demetilacija, redukcija, oksidacija), so poznani še nekateri mehanizmi, ki povečajo odpornost bakterij na živo srebro (Boening, 2000; Wood, 1984):

- vezava na metalotionine
- vezava Hg na celično steno
- precipitacija (npr.: nastanek HgS)

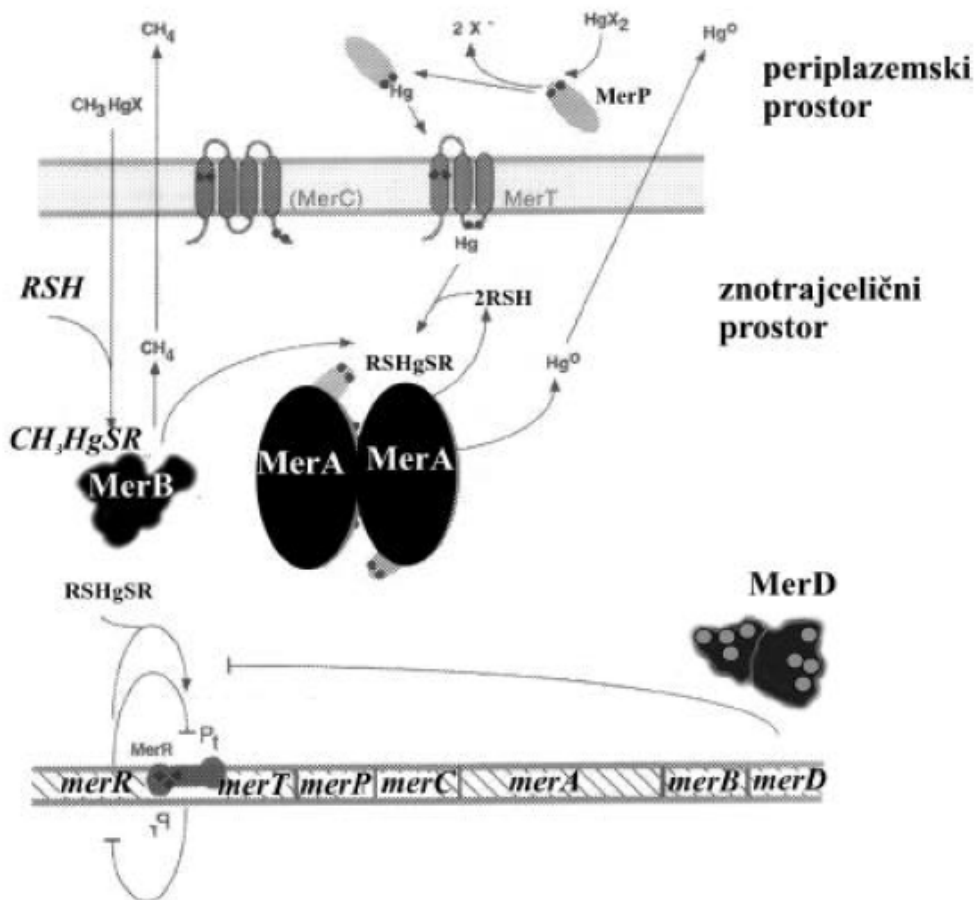
Tudi proti drugim toksičnim kovinam so bakterije razvile podobne mehanizme odpornosti. Najbolj pogoste so: znotrajcelična osamitev kovine, izčrpavanje iz celice, zmanjšana permeabilnost membrane, zunajcelična precipitacija in detoksifikacija. Skoraj vsi mehanizmi odpornosti so kodirani na bakterijskih plazmidih in transpozonih. Bakterije pridobijo odpornost na težke kovine s prenosom genov odpornosti ali spontanimi mutacijami. Posebnost Hg pred drugimi kovinami je, da lahko bakterije s kemijsko transformacijo zmanjšajo ali zvečajo toksičnost živega srebra.

2.2.1.1 Odpornost proti živemu srebru s pomočjo mer operona

Dobro raziskan biološki sistem za detoksikacijo organskih ali anorganskih Hg spojin temelji na *mer* operonu (slika 2.1.). Gre za skupino *mer* genov, ki kodirajo encime, prenašalce in regulatorje, ki spreminjajo reaktivno organsko ali anorgansko obliko živega srebra v reducirano in s tem v relativno inertno elementarno obliko (Hg^0) (preglednica 2.2.). Prenos in redukcija potekata s pomočjo tiolnih skupin cisteinov, na katere se Hg^{2+} zelo dobro veže. Nastali Hg^0 je hlapen, topen v lipidih in lahko pasivno difundira skozi celično membrano, brez posebnega transportnega sistema (Barkay in sod., 2003; Boening, 2000). Taka encimska pretvorba v hlapno obliko omogoča bakterijam, ki imajo *mer* operon, odpornost proti nizkim koncentracijam Hg. *mer* operon je prisoten tako pri Gram pozitivnih, kakor pri Gram negativnih bakterijah. Lociran je na plazmidih, transpozonih in ponekod tudi na kromosomih (Barkay in sod., 2003).

Preglednica 2.2.: Proteini *mer* operona in njihova funkcija

protein	funkcija
MerR	regulatorni protein, pozitivno regulira ekspresijo drugih genov ob prisotnosti Hg^{2+}
MerA	NADPH oksidoreduktaza, reducira $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$
MerB	liaza; cepi vezi Hg-C v organskih spojinah, sprošča se Hg^{2+} , ki vstopa v metabolno pot redukcije $\text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}^0$ z MerA
MerP	periplazmatski protein, ločuje nukleofile od Hg^{2+} iona; tako se Hg^{2+} lahko prenese na MerT
MerT	transmembranski transportni protein, ki prenaša Hg^{2+} ion v celico
MerD	negativni regulator ekspresije genov



Slika 2.1. Mehanizem odpornosti proti živemu srebru v po Gramu negativnih bakterijah s produkti genov *mer* operona (Lapanje, 2005)

2.2.2 Vpliv živega srebra na bakterijske združbe

V naravnih sistemih mikrobne združbe odločilno vplivajo na produkcijo in razgradnjo organskega materiala, razgradnjo okoljskih onesnaževal, pri kroženju hranil in drugih biogeokemijskih procesih. Večina naravnih procesov zahteva koordinirano delovanje bakterij z različnimi metabolnimi sposobnostmi. Ponekod so mikroorganizmi edini, ki so sposobni regeneracije elementa v obliko, ki je ustrezna za prevzem s strani višjih organizmov. Mikrobne združbe, z interakcijo s populacijami makroorganizmov in okoljem, določajo celoten ekosistem (Madigan in sod., 2003).

Naravni habitati mikroorganizmov so zelo raznoliki. Združba mikroorganizmov je prilagojena na okolje, v katerem živi. Ob prisotnosti stresa v okolju, se združba mikroorganizmov spremeni (Moore, 1983; Atlas in sod., 1991; Müller in sod., 2001A; Müller in sod., 2001B; Rasmussen in Sørensen, 2001). Vpliv stresa na združbo je odvisen od trajanja in vrste stresa. Teoretično naj bi se po kratkotrajnem stresu združba vrnila v prvotno stanje, medtem ko dolgotrajni stres povzroči novo spremenjeno stanje združbe. Prilagoditev na nove razmere v okolju, z razvojem vrst odpornih na onesnaževalo, omogoča ohranitev aktivnosti združbe in s tem ohranitev vloge v ekosistemu. V okolju, onesnaženim s težkimi kovinami, lahko torej nekatere vrste izginejo, nekatere se na novo naselijo (Duxbury, 1985; Atlas in sod., 1991; Nazaret in sod., 2003; Lapanje, 2005).

Živo srebro je dober raziskovalni model, kako biotransformacija onesnaževala, vpliva na prilagoditev izpostavljenе združbe. Hg^{2+} spremeni strukturo mikrobne združbe, hkrati pa ga mikrobi lahko biotransformirajo v manj toksično obliko Hg^0 in se s tem ohranijo v spremenjenem okolju. Z opazovanjem genetske, funkcionalne in kulturabilne raznolikosti bakterijskih združb, so raziskovalci preučevali dolgo- in kratkotrajno izpostavitve mikroorganizmov, prisotnih v kopenskih in vodnih okoljih, živemu srebru (Barkay, 1987; Rasmussen in Sørensen, 2001; Müller in sod., 2001A; Müller in sod., 2001B; Ellis in sod., 2001; Lapanje, 2005).

2.2.2.1 Vpliv kratkotrajne izpostavitve živemu srebru na bakterijsko združbo

Vnos živega srebra v nekontaminirano prst je povzročil padec raznolikosti združbe, določene na osnovi morfologije kolonij. Vendar je začetnemu upadu sledil porast raznolikosti na prvotno raven. Povečal se je tudi delež in raznolikost bakterij, odpornih na Hg. To je lahko posledica horizontalnega prenosa genov za odpornost iz odpornih na občutljive bakterije (Rasmussen in Sørensen, 2001). Petersen in sod. (2003) predvidevajo da se ob dodatku kovine, zaradi propada občutljivih vrst oz. sevov, poveča biološka dostopnost hranil. S sprostitvijo hranil se začnejo oportunistični, na kovino odporni sevi, hitro razvijati. To se kaže v porastu deleža rezistentnih bakterij. Rasmussen in Sørensen (2001) poročata tudi o spremembi strukture združbe iz prvotno K-strategistov v r-strategiste pod vplivom stresa povzročenega z Hg. Vnos živega srebra je povzročil tudi upad genetske raznolikosti združbe, določene z metodo DGGE (Rasmussen in Sørensen, 2001). Takojšnjemu upadu je prav tako sledila počasna rast genetske raznolikosti, vendar za razliko od kulturabilnih metod, začetna raven ni bila dosežena. Pri tem se izkaže prednost uporabe molekularnih tehnik pred klasičnimi gojitvenimi saj zajamejo tudi nekulturabilne bakterije (Rasmussen in Sørensen, 2001). Tudi raziskave odziva mikrobne združbe na Hg stres v vodnih okoljih so pokazale podobne rezultate (Barkay, 1987).

2.2.2.2 Vpliv dolgotrajne izpostavitve živemu srebru na bakterijsko združbo

Tudi pri dolgotrajni izpostavljenosti okolja živemu srebru so Müller in sod. (2001A) opazili zmanjšanje genetske raznolikosti združbe. Ohranila pa se je funkcionalna raznolikost, določena na podlagi izkoriščanja različnih substratov. Izkoriščanje specifičnega substrata verjetno ni izključno vezano le na eno bakterijsko vrsto. Tudi kulturabilna bakterijska združba je bila pri dolgotrajni izpostavljenosti živemu srebru strukturno manj raznolika, vsebovala je večji delež rezistentnih in hitrorastočih bakterij (Müller in sod., 2001A; Rasmussen in Sørensen, 2001; Lapanje, 2005). Združba se je torej s selekcijo specifičnih bakterijskih vrst prilagodila na stres v okolju (Lapanje, 2005). Sandaa in sod. (2001) ugotavljajo, da dolgotrajno onesnaženje s težkimi kovinami sicer zmanjša genetsko raznolikost bakterijskih vrst v zemlji, kljub temu pa se vrstna raznolikost

kulturabilnih bakterij rahlo poveča. Ti rezultati podpirajo že dobro znano dejstvo, da kulturabilne bakterije predstavljajo le majhne delež celotne bakterijske združbe v zemlji.

2.2.3 Živo srebro in interakcije z višjimi organizmi

Organska oblika živega srebra (npr.: metil-Hg, butil-Hg) je za višje organizme toksična pri 10-100 krat nižji koncentraciji, kakor anorganska oblika (npr.: HgCl_2). Biološka dostopnost je za toksičnost Hg ključnega pomena. Precipitacija v anaerobnih sedimentih ali adsorpcija na huminski material v zemlji in sedimentih zmanjša biološko dostopnost Hg. Rastline in živali v vodnem okolju prevzemajo Hg skozi površino, medtem ko kopenski organizmi vnašajo Hg s hrano v prebavilo. De in sod. (1985) so pokazali, da večina akumulacije pri vodnih rastlinah poteka skozi korenino. Z akumulacijo tako tudi rastline prispevajo k vnosu Hg v prehranjevalno verigo (Boening, 2000). Stena prebavnega trakta morskih in sladkovodnih rib, predstavlja dobro pregrado za anorganski živo srebro (HgCl_2), vendar je prepustna za Met-Hg. Približno 95 % zaužitega Met-Hg se absorbira skozi steno prebavila in se prerazporedi po vseh tkivih rib. Akumulirana koncentracija živega srebra je odvisna od trofičnega nivoja v prehranjevalni verigi (Boening, 2000).

Lindqvist in sod. (1995) so ugotavljali izločanje in distribucijo anorganskega Hg in organskega Met-Hg v predatorskem hrošču (*Pterostichus niger*). Po 30 dneh hranjenja s hrano z dodanim Hg, se je anorgansko Hg zadržalo večinoma v prebavilu, medtem ko se je metilirano živo srebro enakomerno razporedilo po telesu, kar potrjuje dobro mobilnost Met-Hg in sposobnost akumulacije v tkivih.

Študija Nolde in sod. (2004) je pokazala, da je po 14-dnevni izpostavitvi *Porcellio scaber* anorganskemu Hg, večina Hg ostala v anorganski obliki (kot Hg^{2+}). Približno 3 % zaužitega Hg je žival asimilirala, ostalo je izločila z iztrebki. 20 % asimiliranega Hg je bilo akumuliranega v hepatopankreasu, 55 % v črevesu in 25 % v ostalem delu živali. Meritve asimilacije Met-Hg so pokazale, da je žival asimilirala le 2 % razpoložljivega Met-Hg. S primerjavo asimiliranega in izločenega Met-Hg z zaužitim Met-Hg, so opazili upad Met-

Hg. Predvidevajo, da je demetilacija v črevesju potekala bolj intenzivno kakor metilacija, kar je vodilo v izločanje zaužitega živega srebra kot Hg^{2+} .

Biotransformacija Met-Hg pri večini kopenskih vretenčarjev večinoma poteka v jetrih. Jetra transformirajo škodljive spojine v metabolite, ki se izločijo direktno ali pa se prenesejo v žolčnik za nadaljno detoksikacijo. Od tu vstopi v tanko črevo, kjer se lahko bodisi absorbira ali izloči z iztrebki. Met-Hg lahko prehaja v možgane (Boening, 2000).

2.3 ŽIVO SREBRO V SLOVENIJI

Idrija je industrijsko mesto z drugim največjim rudnikom živega srebra v Evropi. Približno 70 % rude je cinabarita, 30 % pa živorodno živo srebro. V času proizvodnje je rudnik prispeval 13 % (150 000 t) celotne svetovne proizvodnje in je bil po količini proizvedenega živega srebra takoj za rudnikom Almaden v Španiji. Delo v rudniku je potekalo več kot 500 let in je bilo zaustavljeno v začetku leta 1996. V času delovanja topilnic in rudnika je bilo sproščenega 37 000 t Hg v okolje (Gnamuš in Horvat, 1999). Rudniške vode bogate na živem srebru so se izlivala v reko Idrijco. Povišane koncentracije železa in sulfata, kot posledica žganja rude, pa so še danes vidne v reki. Živo srebro v reki Idrijci je tako posledica atmosferskega odlaganja, odnašanja prsti in erozije prežganih ostankov rude, kar se odraža v visokih koncentracijah tako v reki kot v rečnih sedimentih in Tržaškem zalivu (Horvat in sod, 1999; Hines in sod. 2000). Največ depozitov Hg in celotna odzračevalna infrastruktura rudnika je postavljena na gosto poseljenem območju Idrije. Do današnjega dne ostajajo problem območja z nakopičenimi žgalniškimi ostanki, ker predstavljajo osnovne vire emisij Hg. Razporejeni so v 90 km² predela mesta Idrije. Koncentracije Hg v tleh na območju Idrije so močno povišane (Gnamuš, 2002), zato je Idrija odlično vzorčno mesto za raziskovanje vpliva dolgotrajnega onesnaženja s kovinami na ekosistem.

Na mestu vzorčenja (Prenjuta) je bila izmerjena koncentracija Hg 263 µg/g organskega sloja. Na kontrolnem območju (Radlek) je živo srebro prisotno v koncentraciji 0,194 µg/g organskega sloja. Na območju Idrije je tako kar več kot tisočkrat višja koncentracija živega srebra kot v Radleku.

2.4 PREBAVILO KOT MIKROBNI EKOSISTEM

2.4.1 Vloga bakterijske združbe v prebavilu gostitelja

Mikroorganizmi običajno živijo na in v živalskih tkivih v velikem številu. Prebavilo živali je naseljeno s številnimi mikrobi. Študije na termitih in ščurkih, so pokazale na velik pomen mikrobov pri razgradnji zaužite hrane (Dillon in Dillon, 2004). Večina živali namreč nima endogenih encimov za razgradnjo netopnih polisaharidov, kot je npr. celuloza. Metabolne aktivnosti mikrobne združbe v prebavilih, predvsem hidroliza celuloze in hemiceluloze, fermentacija produktov depolimerizacije v kratokoverižne maščobne kisline, ki jih nato reabsorbira gostitelj in kroženje dušika znotraj prebavila, omogočajo razgradnjo in izkoriščanje hrane v gostitelju (Brune, 1998). Pri prežvekovalcih lahko mikroorganizmi, ki jih žival razgradi v siriščniku, služijo kot glavni vir proteinov in vitaminov za žival (Madigan in sod., 2003). Indigena mikroflora živali, s svojo številčnostjo ali produkcijo antibiotskih substanc, preprečuje kolonizacijo prebavil z ne-indigenimi vrstami, kar vključuje tudi patogene mikroorganizme. S tem mikroflora varuje gostitelja pred napadom patogenih mikrobov. Črevo je zaradi bližine in bogatosti vrst, tudi idealno okolje za horizontalni prenos genov, kar omogoča boljšo prilagoditev združbe na okolje (Dillon in Dillon, 2004). Zaradi tesne povezave gostitelja in črevesne mikrobne združbe, ima lahko sprememba združbe, kot posledica vnosa težkih kovin, vpliv tudi na fiziološke procese v živali.

2.4.2 Vloga kopenskih rakov enakonožcev v ekotoksikologiji

Poskusni organizem, vrsto *Porcellio scaber*, Latreille (1804) (Crustacea: Isopoda), uvrščamo med kopenske rake enakonožce. Najdemo jih v zgornjih plasteh zemlje, hranijo se z odpadlimi listi na gozdnih tleh. Sposobni so hidrolitske razgradnje celuloze in oksidativne razgradnje fenolnih sestavin. *P. scaber* ima pomembno vlogo pri fragmentaciji ostankov listja, vključevanju produktov dekompozicije in kroženju mineralov v zemlji (Wieser, 1966).

Kopenski rak enakonožec *P. scaber* je eden izmed najboljše proučevanih organizmov v kopenski ekotoksikologiji. Ustrezna velikost, številčnost, enostavnost za ravnanje v laboratoriju in sposobnost akumulacije kovin, uvrščajo te živali med zelo uporabne organizme za biomonitoring okolja onesnaženega s kovinami. Pomembna lastnost je, da lahko tolerira visoke koncentracije težkih kovin (Hopkin in sod., 1986; Drobne, 1997). Predhodne raziskave (Lapanje, 2005; Zimmer in Topp, 1997) so pokazale, da je bakterijska mikroflora prebavila za rake enakonožce izredno pomembna, saj jim omogoča ustrezno izrabo hranil.

Prebavni sistem *P. scaber* je sestavljen iz prebavne cevi in žlez (hepatopankreasa). Črevo je preprosta ravna cev razdeljena v tri dele: sprednje, srednje in zadnje črevo. Celotno črevo je obdano z mišicami, ki omogočajo peristaltično gibanje in potovanje hrane. Sprednje črevo sestavljata požiralnik in želodec (Štrus in sod., 1995). Srednje črevo je omejeno na žleze (hepatopankreas). Hepatopankreas služi za absorpcijo hranilnih snovi, skladiščenje lipidov, ogljikovih hidratov, proteinov ter za proizvodnjo encimov (Clifford in Witkus, 1971). Sprednje in zadnje črevo sta prekrita s kutikulo. Zadnje črevo zavzema 91 % dolžine črevesa. Sestavljeno je iz sprednjega dela (anteriorne regije), srednjega dela (papilatne regije) in rektuma. Absorpcija hranil poteka zlasti v anteriornem delu in hepatopankreasu, medtem ko se v papilatni regiji absorbirajo voda in ioni (Lane, 1988). Celotna prebava (od hranjenja do iztrebljanja) traja 10 do 15 ur (Alikhan, 1969). Črevo se po stradanju popolnoma izprazni v 18-24 urah (Hartenstein, 1964).

2.4.3 Mikroorganizmi v prebavilu *P. scaber*

Prebavilo kopenskih rakov enakonožcev je dobro definirano mikrookolje. Ima zelo konstantne fizikalno kemijske razmere. Zaradi majhnosti in enostavne strukture je ravnanje z njim enostavno. Črevesna mikroflora pomembno sodeluje pri dekompoziciji organskega materiala, saj so encimi za razgradnjo celuloze, hemiceluloze in lignina bakterijskega izvora (Hartenstein, 1964; Hassal in Jennings, 1975; Uesbeck in Topp, 1995; Kostanjšek in sod., 2002). Poleg tega pa sestava združbe v črevesu odraža razmere v mikrookolju črevesa, torej tudi stres povzročen z onesnaženjem s kovinami. Na črevesno združbo spremembe zunanjih okoljskih dejavnikov (vremenski pogoji, vlaga, temperatura, pH,

prisotnost organskih snovi...) nimajo velikega vpliva. Predvidevamo namreč, da so razmere v črevesju dokaj konstantne in se spreminjajo le ob ekstremnih zunanjih dejavnikih, katerih živali ne morejo tolerirati (Lapanje, 2005). Takšni stresni dejavniki so pogosto snovi, ki pridejo v črevo s hrano (npr.: težke kovine in druga onesnaževala). Zato lahko črevesno bakterijsko mikrofloro rakov enakonožcev uporabimo kot modelni sistem, na katerem se kažejo vplivi onesnaženja z živim srebrom.

Filogenetske analize 16S rRNA so pokazale na raznoliko bakterijsko floro v črevesju (preglednica 2.3.). V črevesju obstaja normalna avtohtona mikroflora, kot tudi normalna alohtona mikroflora (Lapanje, 2005; Kostanjšek, 2002). Avtohtona flora je sposobna kolonizacije prebavila, medtem ko alohtona mikroflora pride v prebavilo s hrano in ni sposobna kolonizacije (Savage, 1978 cit. po Bergu, 1996). RFLP analize praznih čreves so pokazale, da tri četrtine bakterij lahko uvrstimo znotraj treh skupin: *Streptococcus*, *Bacteroides* in *Enterococcus*. Zaporedja so pokazala veliko podobnost z bakterijsko črevesno mikrofloro vretenčarjev. To nakazuje, da obstaja specifična simbiotska anaerobna mikroflora. Ostale bakterije so bile večinoma predstavniki, ki jih običajno najdemo tudi v zemlji (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Neisseria*...) (Kostanjšek in sod., 2002; Lapanje, 2005).

Lapanje (2005) je s filogenetsko analizo 16S rRNA klonske knjižnice pokazal razlike v bakterijskih združbah čreves živali nabranih v kronično onesnaženem okolju s Hg (Idrija) in neonesnaženem okolju (priloga A), kar potrjuje domneve drugih avtorjev, da se ob prisotnosti stresa združba spremeni (Müller in sod., 2001A). Kostanjšek in sod. (2002) predvidevajo, da so mikroorganizmi v črevesu bodisi avtohtoni (sposobni kolonizacije prebavila) ali pa so privzeti s hrano. Mikrobi sposobni kolonizacije prebavil naj bi se evolucijsko razvijali skupaj z gostiteljem, zato Lapanje (2005) predvideva da so se raki enakonožci in njihova črevesna mikrobna združba popolnoma prilagodili na kronično povišane koncentracije Hg, kot posledica 500-letne rudarske aktivnosti v Idriji. Primerjava združb je pokazala, da so v onesnaženem okolju prevladovali predstavniki *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacillus* in *Actinobacteria*. Sorodniki rodu *Bacteroidetes* so bili prisotni samo v neonesnaženem okolju. Le nekaj klonov iz skupine *Gammaproteobacteria* je bilo prisotnih v združbi iz onesnaženega okolja. Njihova

številčnost je bila mnogo višja pri združbi iz neonesnaženega okolja. Ocena vrstne bogatosti, določena z indeksom Chao 1, je pokazala večje OTE (»opažene taksonomske enote«) v klonski knjižnici vzorcev iz neonesnaženega okolja v primerjavi z onesnaženim okoljem (priloga C). Rezulati so jasno kazali na razlike obeh bakterijskih črevesnih združb.

Preglednica 2.3.: Bakterije, ki so bile opisane v prebavilih *P. scaber*

Bakterijske vrste, rodovi	Predel prebavila	Način identifikacije	vir
<i>Achromobacter</i> sorod.	črevo	16S rDNK	Lapanje, 2005
<i>Bacillus</i>	črevo	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2002, Lapanje, 2005
<i>Bacillus cereus</i>	črevo, hrana	izolati	Jorgensen in sod., 1997
<i>Bacteroides</i>	črevo	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2002, Lapanje, 2005
<i>Brevibacterium</i>	črevo	16S rDNK	Lapanje, 2005
Celulolitične bakterije	zadnje črevo, hepatopankreas	izolati	Zimmer in Topp, 1998
<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	črevo	izolati	Lapanje in sod., 2000, Kostanjšek in sod., 2004
<i>Enterococcus faecium</i> sor. <i>E. saccharolyticus</i>	črevo	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2002
Gram pozitivni bacili	hepatopankreas	mikrografije	Wood in Griffiths, 1988
<i>Hepaticola porcellionum</i>	hepatopankreas	16S rDNK	Wang in sod., 2004
<i>Listeria</i>	črevo	16S rDNK	Lapanje, 2005
<i>Mycoplasmatales</i> A1 podskupina	zadnje črevo	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2002
<i>Neisseria</i>	črevo	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2002
<i>Paracoccus</i>	črevo	16S rDNK	Lapanje, 2005
<i>Pseudomonas</i>	črevo	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2002, Lapanje 2005
<i>Rhabdochlamydia porcellionis</i>	hepatopankreas	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2004
<i>Rhizobium/Agrobacterium</i>	črevo	16S rDNK	Lapanje, 2005
<i>Streptococcus</i> sp.	črevo	16S rDNK	Kostanjšek in sod., 2002
<i>Xanthomonas</i> , <i>Pseudoxanthomonas</i>	črevo	16S rDNK	Lapanje, 2005

Tudi določanje kulturabilnih bakterij z metodo CFU je pokazalo, da so nekateri predstavniki prisotni le v črevesih živali iz onesnaženega okolja in obratno. Prav tako je bil v onesnaženem okolju večji delež Hg-rezistentnih bakterij, kakor v združbi iz neonesnaženega okolja (Lapanje, 2005).

2.5 DOLOČANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB

Za določanje strukture mikrobne združbe raziskovalci uporabljajo številne metode: mikroskopija, kultivacija na gojiščih, imunološki testi, analiza DNK, RNK, določanje profila maščobnih kislin... Izbira ustrezne metode je odvisna od tipa vzorca, delovnih možnosti v laboratoriju in željenega nivoja ločljivosti.

2.5.1 Kulturabilne tehnike

Pred razvojem molekularnih tehnik preučevanja genetske raznolikosti, so bile raziskave omejene na metode na osnovi kultivacije bakterij. Takšne metode pokrijejo le aerobne heterotrofne organizme sposobne formiranja kolonij na določenem gojišču. Zimmer (2002) ocenjuje, da je v črevesu rakov enakonožcev možno gojiti le okoli 0,1 % do 1 % vseh bakterij. Zato s podajanjem raznolikosti na osnovi gojitvenih tehnik podcenjujemo celotno raznolikost združbe.

Za identifikacijo mikroorganizmov se danes, poleg klasičnih fenotipskih testov (hidroliza uree, redukcija nitrata do nitrita...), uporabljajo tudi hitri testi, kot so: API, Biolog. Pri hitrih testih nacepimo vzorec v predhodno omočena liofilizirana gojišča nanešena na ploščico. Rast mikroorganizmov se kaže kot sprememba barve. S pomočjo podatkovne baze, identificiramo mikroorganizem. Metoda običajno nima dovolj velikega nivoja ločljivosti, zlasti kadar imamo opraviti z mikrobno združbo v okoljskih vzorcih.

2.5.2 Molekularne tehnike

Strukturo mikrobne združbe lahko določimo tudi na osnovi makromolekul: lipidov, proteinov, nukleinskih kislin. FAME (»Fatty Acid Methyl Esters«) je identifikacijska

metoda na osnovi lipidov (Schutter in Dick, 2000). Za analizo lipide izoliramo, modificiramo do metilnih estrov in analiziramo s plinsko kromatografijo. Kromatogrami lipidnih profilov dajejo značilne vzorce, ki jih med seboj primerjamo. Različica FAME je PLFA (»Phospholipid Fatty Acid«) (Green in Scow, 2000). Sprememba specifične PLFA komponente je indikator za spremembo specifične skupine mikroorganizmov. Prednost PLFA pred kulturabilnimi tehnikami je, da lahko detektiramo mikrobno strukturo v vzorcih brez predhodnega gojenja, je relativno enostavna in omogoča analizo velikega števila vzorcev. Metoda ne omogoča določevanje vrstne sestave, prav tako pa ne more določiti maščobnih kislin v zelo nizkih koncentracijah, ki pa lahko kljub temu predstavljajo pomembne skupine v združbi.

Pri določevanju strukture združbe na osnovi proteinov, elektroforetsko primerjamo proteine neznanega izolata z elektroforetskim profilom znanega izolata. Za identifikacijo uporabljamo tudi imunološke metode, kjer izkoristimo specifičnost vezave antigena s protitelesom. Poznamo veliko število različnih imunoloških metod: imunofluorescenca, radioimunski testi, aglutinacija, ELISA...

Poznamo več metod za določevanje raznolikosti med mikroorganizmi na osnovi analize DNK. Identifikacija na osnovi deleža GC (gvanin+citozin) je nezanesljiva. Kljub temu, da imajo organizmi s podobnimi fenotipi podobna GC razmerja, imajo lahko organizmi podobne GC deleže, a so taksonomsko in filogenetsko različni med seboj (Madigan in sod., 2003).

Za določevanje razlik med DNK lahko uporabimo restrikcijsko analizo. Analizo lahko naredimo za celoten genom (RFLP) ali za izbrani gen (ribotipizacija). Običajno predhodno izbrani gen namnožimo z metodo PCR (metoda verižne reakcije s polimerazo). PCR je pogosto osnova za nadaljne metode določevanja razlik med mikroorganizmi.

Znanih je veliko različnih metod:

- AFLP (»Amplified Fragment Length Polymorphism«): s PCR selektivno pomnožimo restrikcijske fragmente, ki smo jih predhodno dobili z restrikcijskimi endonukleazami. PCR pomnožke ločimo z gelsko elektroforezo. Izvedba AFLP ne zahteva predhodnega poznavanja specifičnih zaporedij DNK in poteka z uporabo dveh specifičnih

oligonukleotidnih začetnikov. Metoda je predvsem uporabna za tipizacijo in preiskavo DNA različnega izvora (Janssen in sod., 1996).

- RAPD - PCR («Random Amplification of Polymorphic DNA»): uporabljamo za identifikacijo specifične variabilnosti med vrstami. Izbrane začetne oligonukleotide za amplifikacijo kromosomske DNK uporabljamo pri manj strogih pogojih PCR namnoževanja (npr. nižjih temperaturah), kar omogoča vezavo tudi na nesorodno DNK. Zaradi variabilnosti v DNK različnih organizmov, pride do različnega števila in velikosti PCR pomnožkov med različnimi vrstami, kar omogoča identifikacijo (Berg in sod., 1994).
- SSCP («Single stranded conformational polymorphism»); PCR pomnožke segrejemo na 95° in jih nato zelo hitro ohladimo. Enoverižna DNK se zvije v 3D strukturo, ki je odvisna od baznih parov. Različne DNK imajo različne 3D strukture, ki različno hitro potujejo na elektroforezi. Pri homolognih DNK fragmentih dobimo eno liso, pri heterolognih pa dve (občutljivost za mutacije, npr. insercije, delecije) (Hayashi, 1991).
- Heterodupleks analiza: dva PCR pomnožka pomešamo v enakih deležih in denaturiramo pri 95°C. Mešanica nato počasi ohladimo. Med ohlajanjem pride do renaturacije in tvorbe heterodupleksov. Vsaka napaka pri nalaganju se pozna kot različna 3D struktura in posledično različna mobilnost na elektroforezi (Nataraj in sod., 1998).

Razvoj hitrih in učinkovitih metod izolacije DNK iz okoljskih vzorcev, brez predhodne kultivacije, je povzročil obsežen porast metod določanja mikrobnih združb na osnovi DNK analize (Miller in sod., 1999; Lapanje, 2005). Pogosto uporabljen genetski marker bakterijskih vrst je gen za 16S RNK. Ti geni so prisotni v vseh organizmih, ni znanih lateralnih prenosov, nekateri deli so evolucijsko ustaljeni, drugi pa so spremenljivi (Woese, 1987). Je enostaven za sekveniranje in za primerjavo sekvenc je dostopna velika podatkovna baza. Če želimo ločiti PCR pomnožke za 16S RNK med seboj, je navadna gelska elektroforeza nezadostna, ker so vsi pomnožki enako veliki. Danes je znanih veliko različnih metod ločevanja pomnožkov enakih dolžin:

- ARDRA («Amplified ribosomal DNA restriction analysis») (Tiedje in sod., 1999)

- t-RFLP (»Terminal restriction lenght polymorphism«) (Kostanjšek in sod., 2002; Lapanje, 2005)
- ITS-RFLP (»Intergenic spacer-restriction fragment lenght polymorphism«) (Viaud in sod., 2000; Ranjard in sod., 2000)
- DGGE (»Denaturing gradient gel electrophoresis«) (Müller in sod., 2001A, Müller in sod., 2001B)
- TGGE (»Temperatue gradient gel electrophoresis«) (Muyzer in Smalla., 1998)

2.5.2.1 Gradientne elektroforeze

Gradientne gelske elektroforeze ločujejo fragmente podobnih dolžin na osnovi gradienta denaturanta (urea, temperatura...). Fragmenti se pri različnih vrednostih gradienta talijo, spremeni se jim konformacija in prenehajo se gibati v električnem polju na gelu. Poznamo več različic, pri naši diplomski nalogi pa smo uporabili metodo TTGE.

TTGE (temperaturna gradientna gelska elektroforeza) je metoda, ki ločuje fragmente enake dolžine na osnovi razlik v sestavi baz. Majhni DNK fragmenti (npr.: PCR produkti 16S rDNK) potujejo pri elektroforezi skozi poliakrilamidni gel v temperaturnem gradientu. Temperaturo višamo v določenih časovnih intervalih, zato je le-ta konstantna na celem gelu, narašča pa časovno. Kot rezultat dobimo linearni temperaturni gradient tekom elektroforeze. DNK fragmenti se pri kritični temperaturi talijo, pri tem se jim spremeni struktura in se prenehajo gibati v električnem polju. Zaradi razlik v DNK dobimo taljenje molekul pri različnih temperaturah. Večinoma se uporablja mešanica 16S rDNK genov, pomnoženih z metodo PCR, iz kompleksnih okoljskih vzorcev. Vsak pas na gelu predstavlja svojo vrsto/rod, kljub temu da obstajajo nekatere domneve o heterogenosti rDNK znotraj ene vrste. Toda to področje je potrebno še dokazati in raziskovati (Nübel in sod., 1996). Pri interpretaciji rezultatov je pomembno, da se zavedamo, da imajo DNK sekvence različnih bakterij lahko isto kritično temperaturo in jih zato na gelu ne ločimo. Dobljeni profil združbe nam prav tako ne pove, ali gre za najbolj zastopane vrste, vrste katerih DNK se najlažje izolira ali za najbolj aktivne vrste v združbi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 METODE

3.1.1 Vzorčenje

Vzorčenje je potekalo na dveh lokacijah:

- (1) okolje onesnaženo z živim srebrom – Idrija.
- (2) neonesnaženo okolje - Radlek.

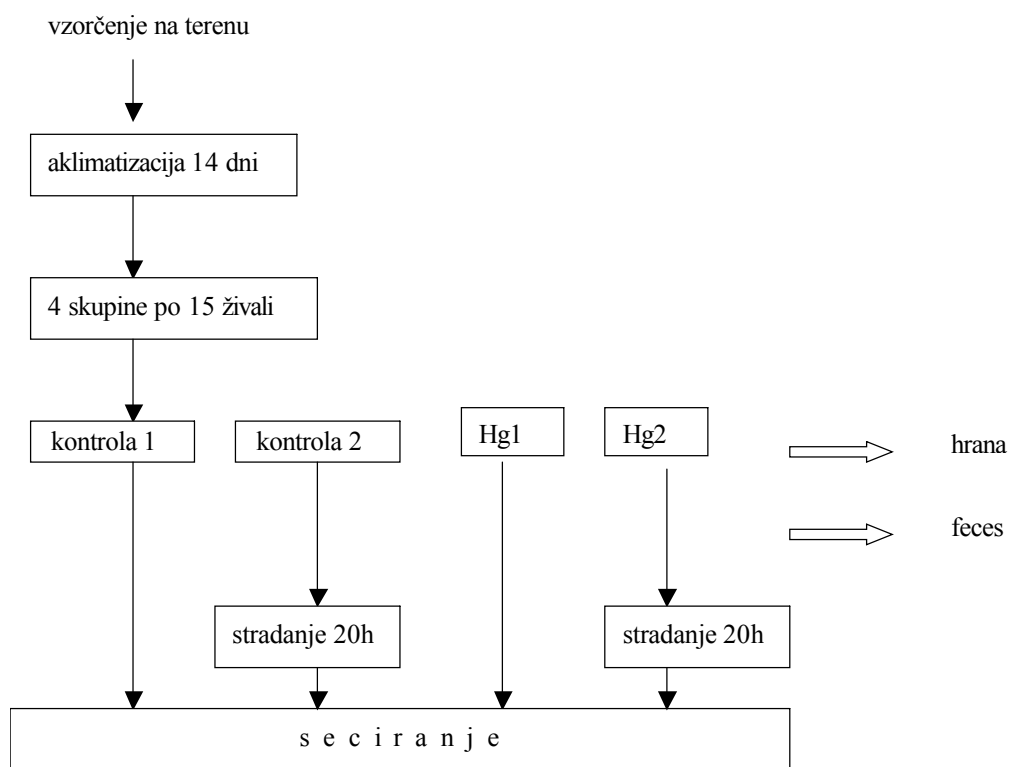
Živali (*Porcellio scaber*), Latreille (1804), (Crustacea: Isopoda) smo nabrali v naravnem okolju na dveh različnih lokacijah: Radlek in Idrija. Jesensko vzorčenje je potekalo oktobra 2005. Pomladansko vzorčenje na obeh lokacijah je potekalo aprila 2006. Živali iz Idrije smo nabrali na levem delu Idrijice nasproti nekdanje topilnice. Tu so bili odloženi žgalni ostanki nekdanjih starih žgalnic. Zemljo in leskove liste smo nabrali v bližini tovarne Kolektor. Radlek je vas na območju Bloške planote, kjer v preteklosti ni bilo nobene industrijske aktivnosti. Vzorci iz te lokacije so bili kontrolni vzorci, neonesnaženi z živim srebrom.

3.1.2 Prehranjevalni poskus

Živali smo 2 - 3 tedne aklimatizirali v laboratorijskih razmerah z zemljo in listi, nabranimi v njihovem naravnem okolju. Živali iz vsake lokacije smo nato razdelili v štiri skupine po 15 osebkov (slika 3.1.). Prva in druga skupina sta bili kontrolni skupini, tretja in četrta sta bili izpostavljeni skupini. Vsako žival smo stehtali, dali v ločene petrijevke in na vsake 2 dni zamenjali hrano, prešteli in odstranili iztrebke. Tako liste kot iztrebke, smo shranili na -20 °C. Kot hrano smo uporabili posušene liste leske (*Corylus avellana*), nabrane v neonesnaženem okolju na Radleku in na izviru Kamniške bistrice. V kontrolni skupini smo uporabili hrano, neonesnaženo z živim srebrom (liste smo namazali s destilirano vodo). V izpostavljeni skupini pa smo vsak drugi dan zamenjali liste (hrano) in namazali z raztopino živega srebra, da smo dosegli koncentracijo 10 µg Hg/g suhe teže lista. Po 14 dneh

prehranjevalnega poskusa, smo živali ponovno stehali in secirali po eno kontrolno in eno izpostavljeno skupino iz vsakega vzorčnega kraja; medtem ko smo ostali dve skupini pustili stradati 20 ur. Po 20 urah stradanja smo prešteli iztrebke in živali secirali. Pri nestradanih skupinah smo za nadaljne analize uporabili polna črevesa, pri stradanih pa prazna. Za analizo upada prehranjevanja jesenskih živali smo uporabili ANOVA statistiko.

Živalim smo po končani izpostavitvi določili spol, fazo levitve, opisali črevo in hepatopankreas. Sledila je sekcija živali, pri čemer smo s sterilnim orodjem ločili črevesa in hepatopankreas. Črevesa živali posameznih skupin smo prenesli v 250 µl fosfatnega pufra v epruvete po Eppendorfu in jih nato zmacerirali s sterilno pestilo.



Slika 3.1.: Shema jesenskega in spomladanskega prehranjevalnega poskusa

3.1.3 Molekularne tehnike

Izolacija DNK

Glede na predhodne raziskave, smo za izolacijo DNK uporabili metodo mehanske dezintegracije celic s steklenimi kroglicami (Miller in sod., 1999; Lapanje, 2005). DNK smo izolirali iz 15 čreves posamezne skupine in iz fecesov. Postopek izolacije smo naredili po naslednjem protokolu (Lapanje, 2005):

- ❑ v epruvete po Eppendorfu smo stehali 375 mg steklenih kroglic in avtoklavirali
- ❑ v vzorec smo dali 250 µl fosfatnega pufra → zmečkali s sterilno pestilo
- ❑ dodali smo 300 µl SDS pufra
- ❑ dobro zmečkan vzorec smo prenesli v epruvete po Eppendorfu s steklenimi kroglicami
- ❑ dodali smo 375 µl FKI (25:24:1)
- ❑ stresali smo 2 min na stresalniku na 26,6 Hz
- ❑ centrifugirali pri 10 000 obr/min 5 min pri 4 °C
- ❑ odvzeli smo zgornjo vodno fazo → ekstrakt A
- ❑ odstranili smo FKI fazo in dodali 375 – 400 µl SDS pufra in 375 µl FKI in dobro premešali
- ❑ postopek smo ponovili še dvakrat ! → ekstrakt B in C
- ❑ ekstraktom A, B, C smo dodali 300 µl FKI, premešali
- ❑ centrifugirali pri 14 000 obr/min 5 min pri 22 °C (sobna T)
- ❑ postopek smo ponovili trikrat
- ❑ DNA smo precipitirali z amonijevim acetatom (1/4 V 10M amonijevega acetata, premešamo in 2V 96 % EtOH) → inkubacija 1h pri –20 °C
- ❑ centrifugirali pri 14 000 obr/min 30 min pri 4 °C
- ❑ odpipetirali supernatant
- ❑ spirali z 750 µl 80 % EtOH
- ❑ centrifugirali 15 min pri 14 000 obr/min
- ❑ DNK smo posušili ob gorilniku

- posušeno DNK smo raztopili v 100 µl ddH₂O in shranili pri –20 °C

Čiščenje DNK

Da bi si zagotovili čimbolj čisto DNK, smo vzorce čistili z metodo na osnovi manjših kolon Sephadexa. S tem smo odstranili inhibitorne substance, ki v postopku izolacije DNK precipitirajo skupaj z DNK in lahko motijo potek PCR reakcije. Postopek obsega dva dela: v prvem delu pripravimo kolone, v drugem sledi nanos ter čiščenje vzorcev (Lapanje, 2005).

A. Priprava kolon:

- Sephadex G200 smo rehidrirali v sterilni bidestilirani vodi
- nato smo trikrat spirali kroglice Sephadex G200 v sterilnem pufru HSTE
- po zadnjem spiranju smo dodali toliko pufra HSTE, da je prekril kroglice Sephadex
- suspenzijo smo avtoklavirali
- pripravili smo centrifugirke in jih avtoklavirali
- v injekcijsko brizgo smo aseptično prenesli sterilno vato iz umetnih vlaken in jo z batom potisnili na dno brizge
- v brizgo smo dali 1 ml suspenzije kroglic
- nato smo centrifugirali pri 1100 obr/min (130 g) 10 minut pri nizkih T (okoli 8 °C).
To smo ponavljali toliko časa, da smo dobili volumen kroglic približno 1 ml
- kolono smo dvakrat sprali s 100 µl sterilnega pufra HSTE
- kolono smo prenesli v novo centrifugirko z novo epruveto po Eppendorfu

B. Čiščenje vzorcev DNK

- 100 µl vzorca smo nanесли v kolono
- centrifugirali pri 130 g 10 min
- DNK smo trikrat izprali s 100 µl pufra HSTE pri 130 g 10 min
- DNK smo precipitirali z amonijevim acetatom (1/4 V 10M amonijevega acetata, premešamo in 2V 96 % EtOH) → inkubacija 1h pri –20 °C
- centrifugirali pri 14 000 obr/min 30 min pri 4 °C

- ❑ odpipetirali supernatant
- ❑ spirali z 750 µl 80 % EtOH
- ❑ centrifugirali 15 min pri 14 000 obr/min
- ❑ DNK smo posušili ob gorilniku
- ❑ izolirano DNK smo raztopili v 20 µl bidestilirane sterilne vode in shranili na -20 °C

PCR za 16S rDNK

Za pomnoževanje 450bp velikega dela 16S rDNK iz celokupne izolirane DNK smo uporabili OZ U968-GC in L1401 (Muyzer in Smalla., 1998). OZ U968-GC je imel pripet 46bp dolg rep iz baznih parov GC (Nübel in sod., 1996), ki je kasneje omogočal boljše ločevanje produktov v TTGE postopku. Za vsak vzorec smo pripravili dve PCR reakciji po 23,5 µl. Reakcijsko mešanico za posamezen vzorec je bila naslednja (Lapanje, 2005):

kemikalija	volumen
H ₂ O	15,8 µl
pufer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
BSA	0,2 µl
primer 1	1 µl
primer 2	1 µl
dNTP (40 mM)	0,25 µl
Taq polimeraza (5 U/µl)	0,75 µl

Dodali smo 1 µl vzorca DNK, katerega smo predhodno redčili 1: 20.

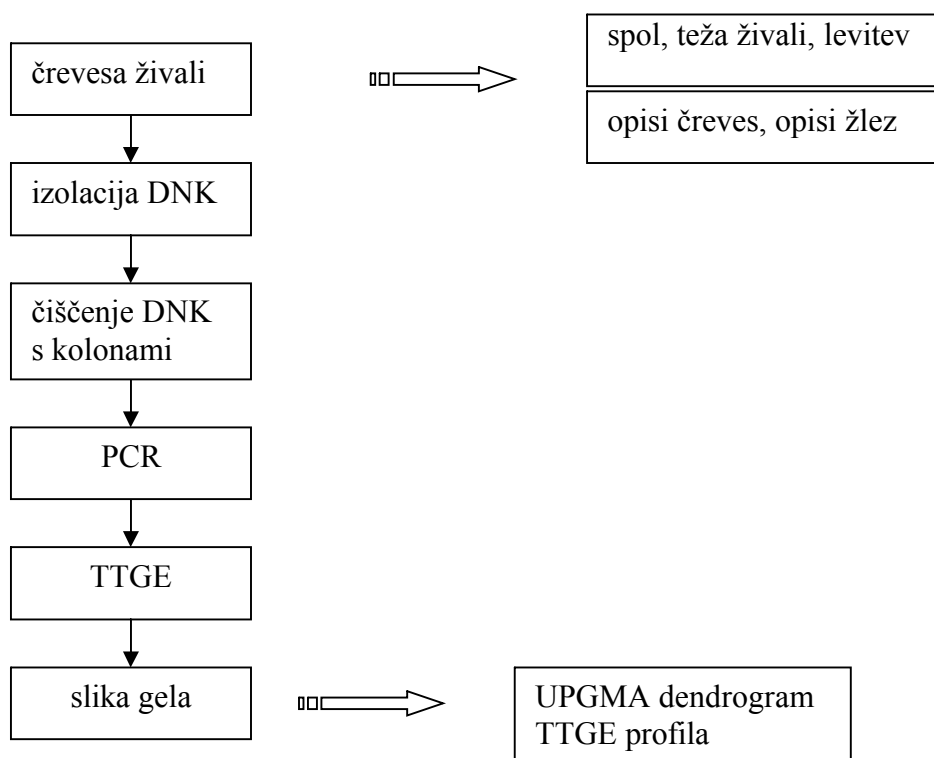
PCR program je bil naslednji (Lapanje, 2005):

- ❑ predhodna denaturacija pri 92 °C, 3 min
- 35 ciklov
- ❑ denaturacija pri 92 °C, 30 sec

- prileganje pri 54 °C, 30 sec
- pomnoževanje pri 68 °C, 1 min
- inkubacija ob zaključku programa na 72 °C, 7 min

Prisotnost in velikost PCR pomnožkov smo preverjali na 1 % agaroznem gelu pripravljenim z 0,5X TBE pufrom. Elektroforezo smo izvedli v 0,5X TBE pufu pri 113 V napetosti 30 minut.

Pomnožene produkte smo, zaradi boljše detekcije na TTGE gelu, koncentrirali. Koncentriranje vzorcev smo naredili s potopkom precipitacije z amonijevim acetatom in nato posušili DNK ter jo shranili na -20 °C.



Slika 3.2.: Shema molekularnih tehnik uporabljenih pri vzorcih polnih in praznih čreves pri jesenskih živalih *P. scaber*

TTGE (poliakrilamidna elektroforeza v temperaturnem gradientu)

Naredili smo raztopino 30 ml 8 % poliakrilamidnega gela (Lapanje, 2005):

- ❑ Zatehtali smo 10,8 g uree in jo raztopili v 20 ml destilirane vode, dodali smo 0,75 ml 50x TAE in 6 ml 40 % poliakrilamid/bisakrilamida in mešanico degazirali
- ❑ Degazirani mešanici smo dodali 300 µl 10 % amonijevega persulfata in 30 µl TEMED, premešali in vsebino zlili med stekleni plošči (razmik med ploščama je 0,75 mm)
- ❑ Pustili smo polimerizirati 90 min
- ❑ V elektroforezno banjico smo nalili 1,25X TAE in segreli na 54 °C
- ❑ Pripravili smo vzorce z barvilom v razmerju 1:1
- ❑ Pred nanosom vzorcev smo izključili mešalo in grelec in sprali jamice na gelu z 1.25X TAE
- ❑ V prvo in zadnjo jamico smo nanесли 5 µl markerja – lestvico λ/PstI
- ❑ Ponovno smo prižgali grelec, da je temperatura zopet dosegla 54 °C
- ❑ Nato smo prižgali vir napetosti na 20 V in pri tej izvajali elektroforezo 15 min
- ❑ Po 15 min smo izključili vir napetosti, nastavili končno temperaturo 68 °C in korak spremembe T (0,7 °C/h)
- ❑ Nato smo nastavili vir napetosti 70 V in izvajali TTGE 20 ur
- ❑ Po končani elektroforezi smo ugasnili napajalnik napetosti, grelec in črpalko
- ❑ Razstavili smo kaseto z gelom
- ❑ Na gelu smo porezali vrh gela kjer smo nanašali vzorce
- ❑ Gel smo barvali z barvilom syber green 15 minut, ki smo ga predhodno redčili 1: 10 000
- ❑ Gel smo razbarvali v destilirani vodi 15 minut in slikali z UVI photo sistemom za obdelavo slike

Analiza gela:

TTGE gel smo analizirali v programu GelManager (Biosystematica, Devon, Velika Britanija). Uporabili smo Pearsonov koeficient podobnosti, ki upošteva relativno pozicijo fragmentov v gelu in njegovo intenziteto. S pomočjo programa GelManager smo narisali UPGMA drevesa na podlagi izračunanih Pearsonovih koeficientov korelacije (Lapanje, 2005).

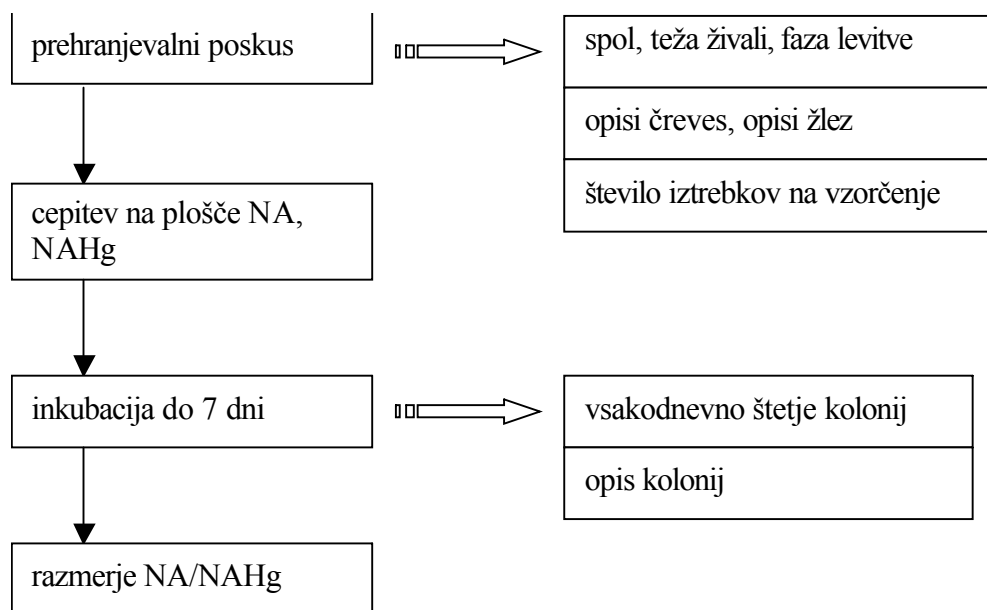
3.1.4 Določanje števila bakterij odpornih proti živemu srebru in celokupnega števila kulturabilnih bakterij z metodo CFU

Priprava plošč s hranilnim agarjem in Hg selekcijskih plošč

Celokupno število kulturabilnih bakterij smo določili po metodi CFU na ploščah s hranilnim agarjem (NA). Bakterije, odporne na Hg, smo izolirali na ploščah s hranilnim agarjem (NA) in dodanim Hg. Založno koncentracijo Hg raztopine smo naredili v bidestilirani vodi iz HgCl_2 . Iz založne raztopine smo dodali ustrezen volumen v avtoklavirano gojišče NA. Koncentracija živega srebra v gojišču je bila 8,4 $\mu\text{g/ml}$. Gojišče smo predhodno ohladili na 55 °C in reoksigenerirali z močnim pretresanjem, da smo preprečili redukcijo Hg^{2+} v Hg^0 in izhlapevanje Hg^0 ter posledično znižanje koncentracije Hg^{2+} v gojišču (Summers, 1978).

Določanje CFU v polnih in praznih črevesih

Vzorci posameznih čreves (polnih, praznih) smo zmacerirali z sterilno pestilo in jih redčili v fiziološki raztopini (9 ml 0,9 % NaCl in 1 ml raztopine). Naredili smo serijo redčitev do 10^{-4} . Na plošče Na in NAHg smo nanесли 100 μl ustrezne redčitve. Vsakodnevno smo preštevali kolonije in inkubirali plošče z vzorci do 7 dni.



Slika 3.3.: Shema določanja CFU polnih in praznih čreves spomladanskih živali *P. scaber*

3.2 MATERIALI

3.2.1 Izolacija DNK

0,12 M fosfatni pufer

NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O	2,65 ml
NaHPO ₄ × 2H ₂ O	47,35 ml
dH ₂ O	50 ml

SDS pufer

Sestava:	10 % SDS
	100 mM NaCl
	500 mM Tris
	pH 8

10 M amonijev acetat

FKI (fenol:kloroform:izoamilalkohol) (25:24:1)

3.2.2 Čiščenje DNK

HSTE pufer

Sestava: 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
100 mM NaCl
pH 8

3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

TBE pufer

TRIS baza	108 g
borova kislina	55 g
0,5 N EDTA (pH 8)	40 ml
destilirana voda	do 1000 ml

1% agarozni gel

agaroza	0,5 g
5X TBE	5 ml
destilirana voda	45 ml

Etidijev bromid 10 mg/ml

V 100 ml vode smo dodali 1 mg etidijevega bromida in mešali z magnetnim mešalom več ur, da se je barvilo raztopilo.

3.2.4 TTGE

30 ml 8 % poliakrilamidni gel

40 % poliakrilamid/bisakrilamid	6 ml
50X TAE	0,75 µl
Urea	10,8 g
TEMED	30 µl
10 % amonijev persulfat	300 µl

1,25X TAE

50X TAE	175 µl
---------	--------

destilirana voda do 7 l

3.2.5 Hranilni agar (NA)

nutrient broth	8 g
NaCl	5 g
agar	15 g
destilirana voda	do 1 l

3.3 KEMIČALIJE

SIGMA CEMICALIS C.. St. Louis, Mo, ZDA

- EDTA
- Agaroza
- Baza TRIS
- Etidijev bromid

MERCK, Darmstadt, Nemčija

- NaCl

4 REZULTATI

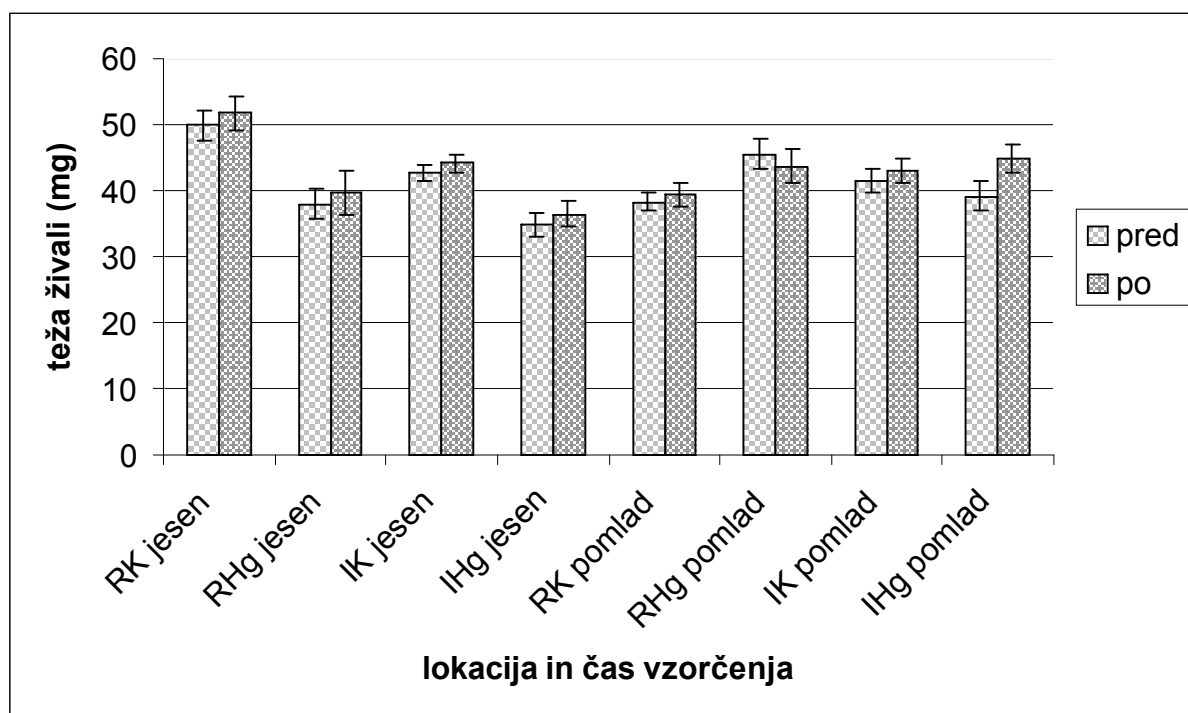
4.1 PREHRANJEVALNI POSKUS Z ŽIVIM SREBROM

Prehranjevalni poskus z živim srebrom smo izvedli dvakrat: jeseni in spomladi. V poskusih smo uporabili živali obeh spolov vrste *P. scaber*. Po prehranjevalnem poskusu nismo opazili statistično značilnih sprememb v telesni teži živali (slika 4.1.). Pri živalih nabranih oktobra 2005 se je, tekom prehranjevalnega poskusa, od 113 živali levilo 55. Pri spomladanskih živalih se je od skupno 98 levilo 30 živali. Stopnja preživetja jesenskih živali tekom prehranjevalnega poskusa je bila višja, kakor pri spomladanskih živalih (preglednica 4.1.). Prav tako so živali iz Radleka imele višjo stopnjo preživetja kakor živali iz Idrije. Med stradanjem so izločile v povprečju 3 iztrebke na žival v 20 urah stradanja.

Preglednica 4.1.: Stopnja preživetja posameznih skupin živali *P. scaber** med prehranjevalnim poskusom

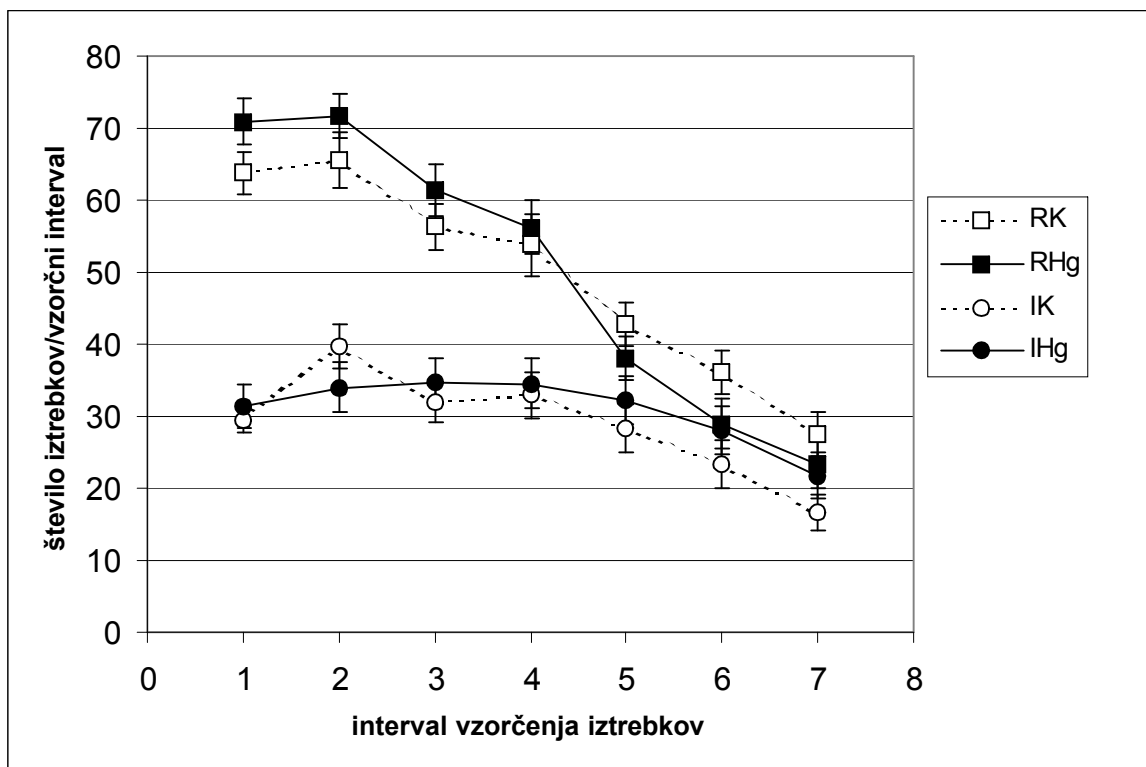
	kontrolna skupina Radlek	Hg izpostavljena skupina Radlek	kontrolna skupina Idrija	Hg izpostavljena skupina Idrija
Stopnja preživetja jesenskih živali (%)	97	100	100	90
Stopnja preživetja spomladanskih živali (%)	100	90	67	80

* začetno število živali v posamezni skupini je bilo 30

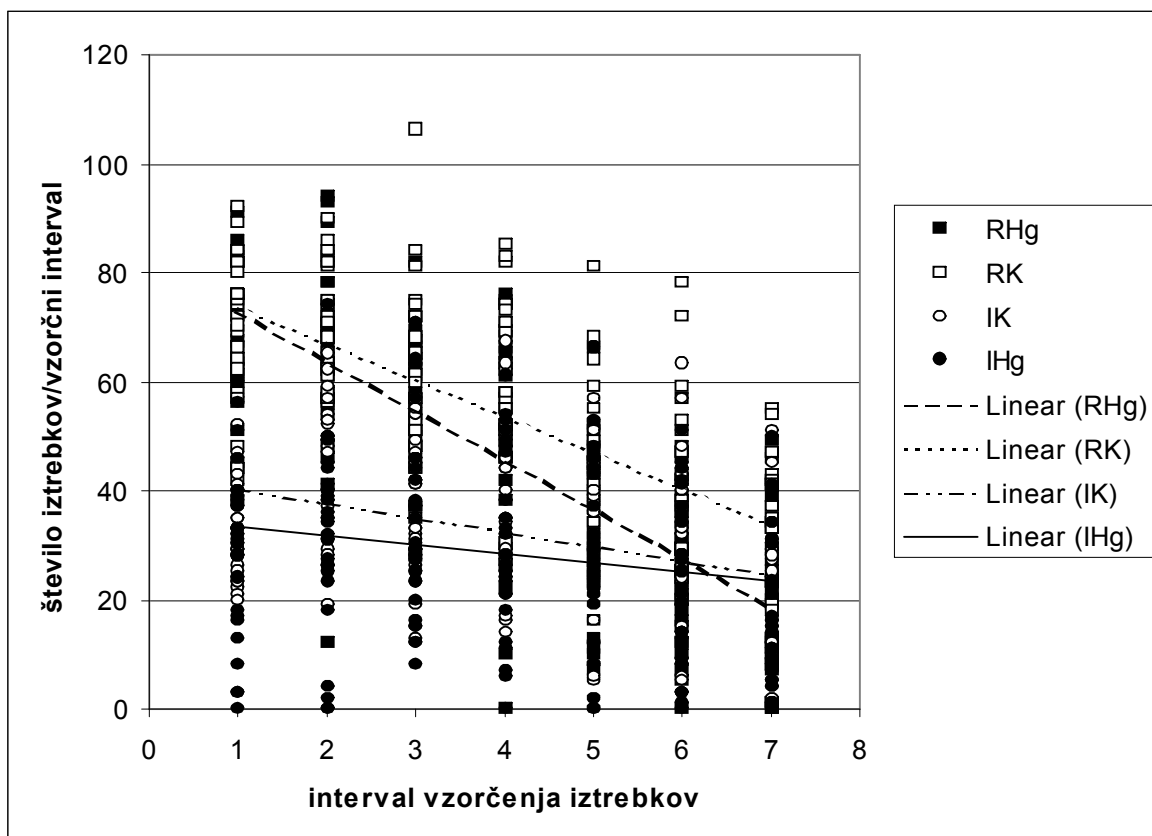


Slika 4.1. Povprečne teže nabranih živali vrste *P. scaber* v različnih vzorčevalnih lokacijah in časih (RK – Radlek kontrolna skupina, RHg – Radlek izpostavljena skupina, IK – Idrija kontrolna skupina, IHg – Idrija izpostavljena skupina)

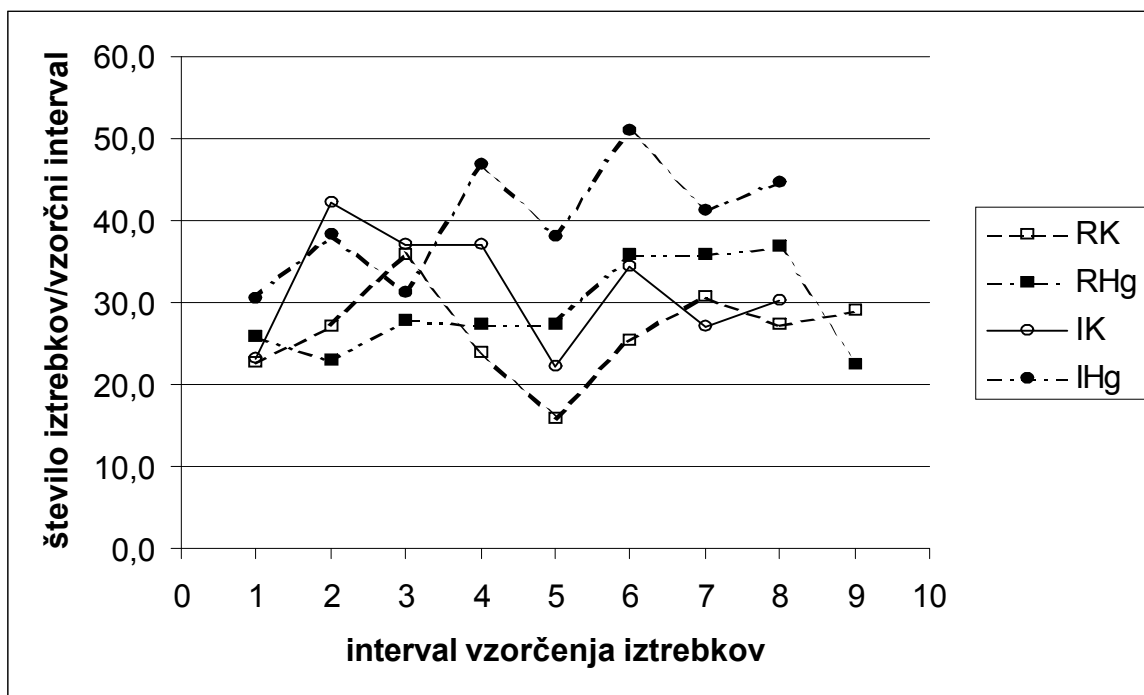
Tekom prehranjevalnega poskusa se je število iztrebkov, v vseh skupinah jesenskega vzorčenja, zmanjševalo. Število izločenih iztrebkov je ocena intenzivnosti prehranjevanja živali. Hrana je, tako v jesenskem kot v spomladanskem poskusu, vsebovala Hg v koncentraciji 10 µg/g suhe teže lista. Število produciranih iztrebkov na skupino živali se je hitreje zmanjševalo pri živalih izpostavljenimi živemu srebru iz neonesnaženega okolja (Radlek), kakor pri kontrolni skupini iz iste lokacije. Po ANOVA statistiki (slika 4.3.), sta krivulji obeh skupin iz neonesnaženega okolja, statistično različni. Trend upada prehranjevanja živali iz Idrije je bil, pri Hg izpostavljeni skupini manjši, kakor pri kontrolni skupini (slika 4.2., slika 4.3.). ANOVA statistika med obema krivuljama prehranjevanja živali iz Idrije ni pokazala razlik.



Slika 4.2. Število izločenih iztrebkov na vzorčni interval na žival *P. scaber* iz Radleka in Idrije tekom 15 dnevnega jesenskega prehranjevalnega poskusa (RK – Radlek kontrola, RHg – Radlek Hg izpostavljena skupina, IK – Idrija kontrola, IHg – Idrija Hg izpostavljena skupina). Odkloni prikazujejo vrednosti standardne napake. Interval vzorčenja je dva dni.



Slika 4.3. Trend upada števila izločenih iztrebkov na žival v jesenskem prehranjevalnem poskusu, vrednosti so dobljene z linearno regresijo (RK – Radlek kontrolna skupina, RHg – Radlek Hg izpostavljena skupina, IK – Idrija kontrolna skupina, IHg – Idrija Hg izpostavljena skupina). Interval vzorčenja je dva dni.



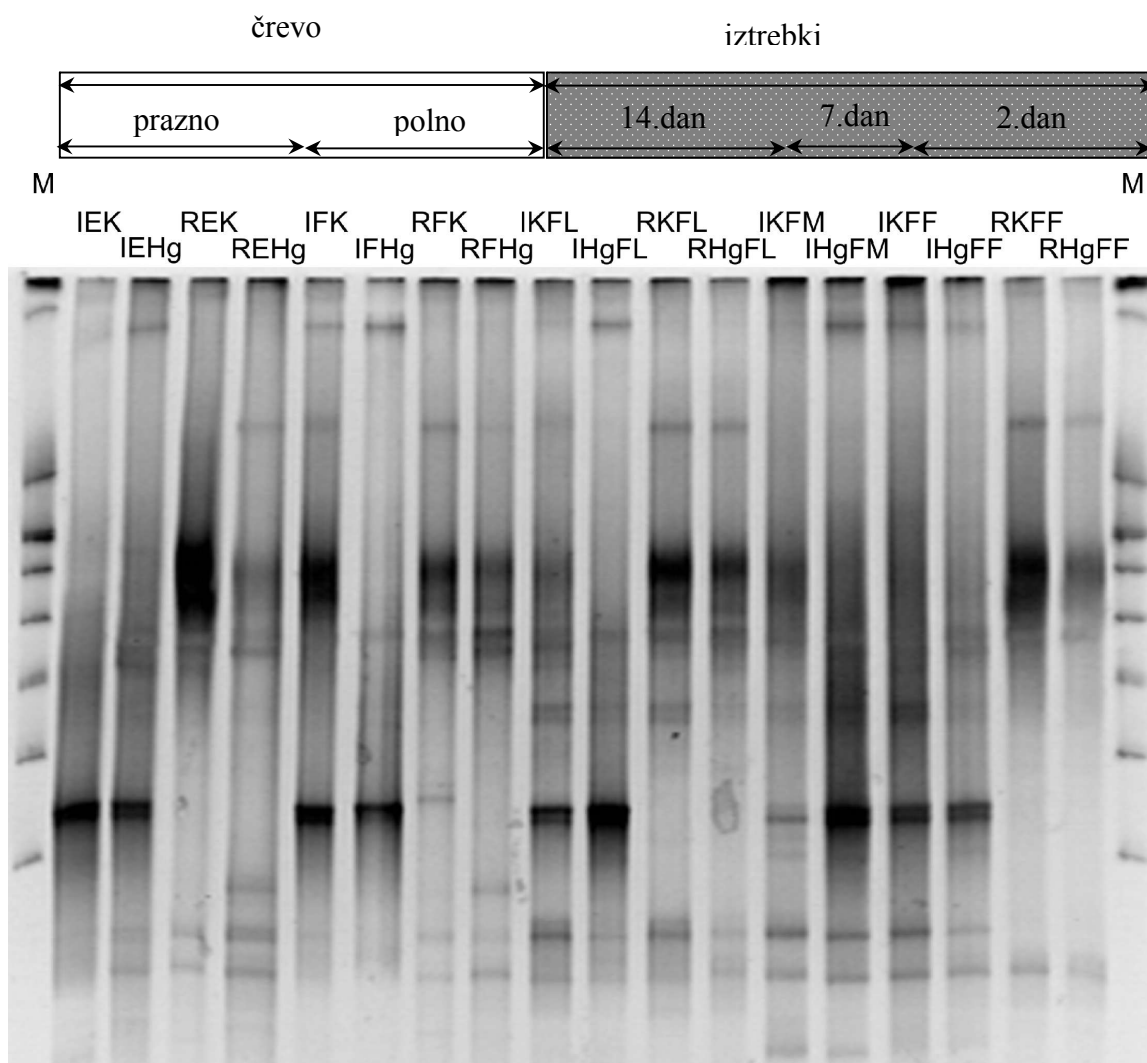
Slika 4.4. Število izločenih iztrebkov na vzorčni interval živali *P. scaber* iz Radleka in Idrije tekom 15 dnevnega spomladanskega prehranjevalnega poskusa (RK – Radlek kontrola, RHg – Radlek Hg izpostavljena skupina, IK – Idrija kontrola, IHg – Idrija Hg izpostavljena skupina). Interval vzorčenja je dva dni.

Pri živalih spomladanskega vzorčenja nismo zaznali upada prehranjevanja.

4.2 RAZNOLIKOST BAKTERIJSKIH POPULACIJ, DOLOČENA Z METODO TTGE

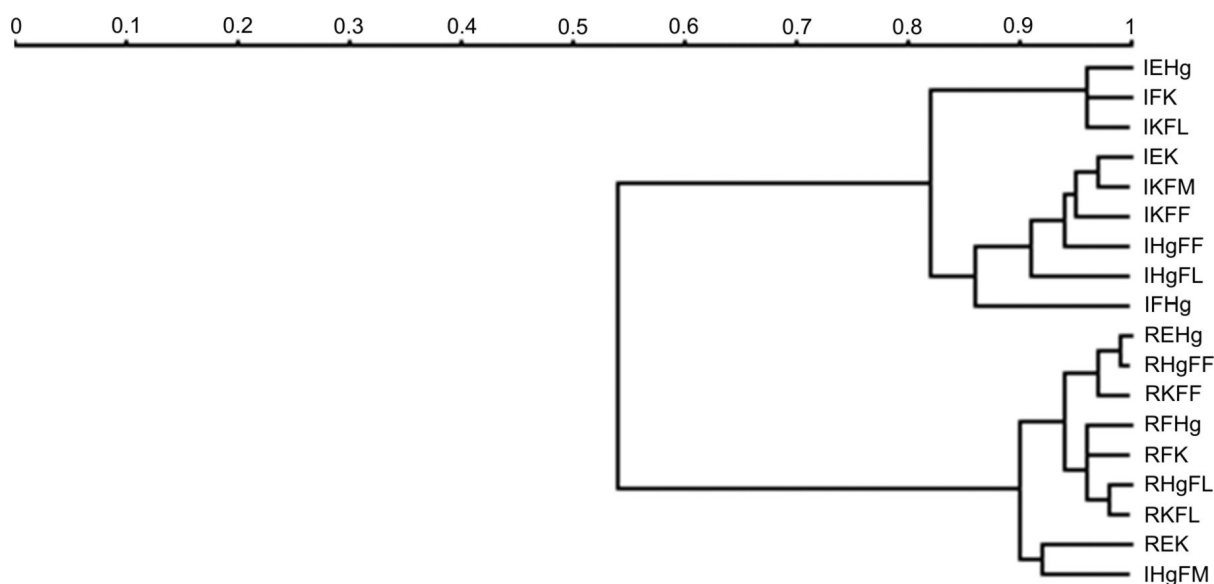
Raznolikost bakterijske združbe v prebavilu rakov enakonožcev smo določevali z metodo gradientne elektroforeze (TTGE), kot je opisano v poglavju materiali in metode. Živali, ki smo jih uporabili, smo vzorčili na Radleku in Idriji oktobra 2005. TTGE profil dela 16S rDNK je pokazal razlike med bakterijskimi združbami čreves živali iz različnih skupin: izpostavljenih in neizpostavljenih iz obeh vzorčnih lokacij (slika 4.5.). Profil združbe praznih čreves se je razlikoval od profila združbe polnih čreves. Se je pa profil veliko bolj razlikoval med živalmi iz Idrije in iz Radleka. Nekateri fragmenti so bili prisotni v polnih in praznih črevesih le pri živalih iz Idrije.

Prav tako se med seboj razlikujejo profili genov za 16S rDNK v bakterijski združbi iztrebkov, vzeti po 2., 6. in 14. dnevu prehranjevalnega poskusa. To pomeni, da se je struktura bakterijske združbe med poskusom spreminjala. Opaziti je bilo izginotje določenih fragmentov in pojavitev novih tekom poskusa. Nekateri fragmenti so bili prisotni le pri fecesih živali iz Idrije in nekateri le pri živalih iz Radleka.

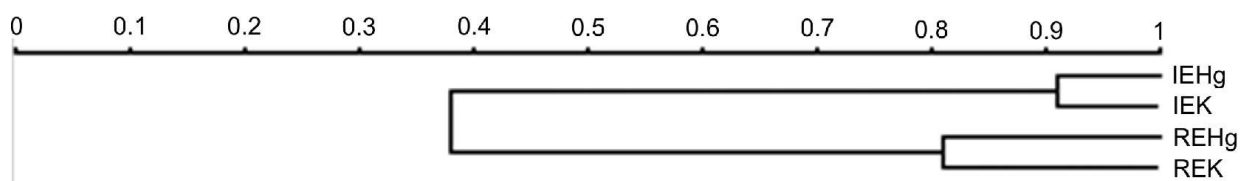


Slika 4.5. TTGE profil bakterijskih združb v črevesih in iztrebkih *P. scaber* med 15 dnevnim jesenskim prehranjevalnim poskusom (I – Idrija, R – Radlek, E – prazno črevo, F – polno črevo, K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, FF – iztrebki po 2. dnevu, FM – iztrebki po 6. dnevu, FL – iztrebki po 14. dnevu, M - marker)

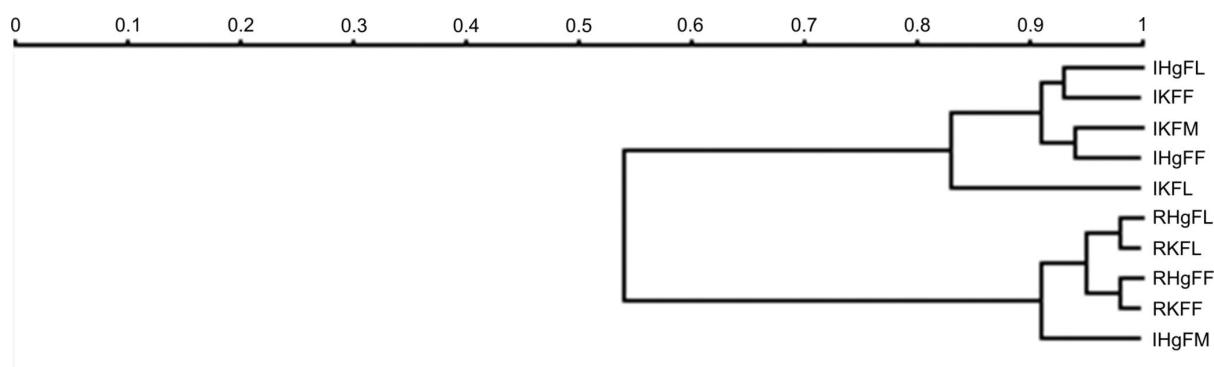
Natančna analiza TTGE profilov je pokazala grupiranje profilov bakterijske združbe polnih in praznih čreves glede na lokacijo (slika 4.6.). Analiza združb praznih čreves je pokazala večje vrednosti Pearsonovih koeficientov korelacije združbe iz onesnaženega okolja, kakor iz neonesnaženega (slika 4.7.). Profil združbe v iztrebkih je pokazal ločeno grupiranje vzorcev iztrebkov po 2., 6. in 14. dnevu pri živalih iz neonesnaženega okolja (slika 4.8.).



Slika 4.6. UPGMA dendrogram TTGE profilov bakterijskih združb polnih, praznih čreves in fecesov *P. scaber* (I – Idrija, R – Radlek, E – prazno črevo, F – polno črevo, K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, FF – iztrebki po 2.dnevu, FM – iztrebki po 6.dnevu, FL – iztrebki po 14.dnevu)



Slika 4.7. UPGMA dendrogram TTGE profilov bakterijskih združb praznih čreves *P. scaber* (IEK – Idrija prazno črevo izpostavljena skupina, IEK – Idrija prazno črevo kontrolna skupina, REHg – Radlek prazno črevo izpostavljena skupina, REK – Radlek prazno črevo kontrolna skupina)



Slika 4.8. UPGMA dendrogram TTGE profilov bakterijskih združb iztrebkov *P. scaber* iz Radleka in Idrije po 2., 6., in 14.dnevu prehranjevalnega poskusa (I – Idrija, R – Radlek, K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, FF – iztrebki po 2.dnevu, FM – iztrebki po 6.dnevu, FL – iztrebki po 14.dnevu)

4.3 ŠTEVILO KULTURABILNIH HETEROTROFNIH BAKTERIJ DOLOČENO Z METODO CFU

V vzorcih (polna in prazna črevesa) smo z metodo CFU ugotavljali razmerje med bakterijami, ki jih lahko gojimo na trdnih gojiščih brez Hg (NA) in na selektivnih gojiščih z dodanim živim srebrom (NAHg). Živali, ki smo jih uporabili, so bile nabrane aprila 2006 na Radleku in v Idriji. Število kulturabilnih bakterij smo določevali, pred in po prehranjevalnem poskusu, pri živalih iz obeh lokacij. Za določitev kulturabilnih bakterij pred prehranjevalnim poskusom, smo iz vsake lokacije uporabili deset živali; pet s praznimi in pet s polnimi črevesi. Po prehranjevalnem poskusu pa smo, iz vsake lokacije, uporabili tri živali s praznimi in tri s polnimi črevesi.

V polnih črevesih živali, nabranih v neonesnaženemu okolju, je bil delež kulturabilnih bakterij večji, kakor pri živalih iz onesnaženega okolja. V praznih črevesih živali nabranih iz neonesnaženega okolja, pa je bilo manj kulturabilnih bakterij kot v onesnaženih krajih (tabela 4.1.).

V vseh krajih je bilo število bakterij, odpornih na Hg, manjše od števila CFU vseh kulturabilnih bakterij. V črevesih živali iz neonesnaženega okolja (Radlek) je bil delež Hg odpornih bakterij zelo nizek. Tudi po prehranjevalnem poskusu se delež odpornih bakterij ni bistveno povečal ne pri kontrolni in ne pri izpostavljeni skupini. Nekoliko večji delež smo opazili pri živalih izpostavljenih živemu srebru (0,1 % v polnem in 0,05 % v praznem črevesu), vendar je to lahko posledica napake same metode in ne povečanja odpornih bakterij v združbi.

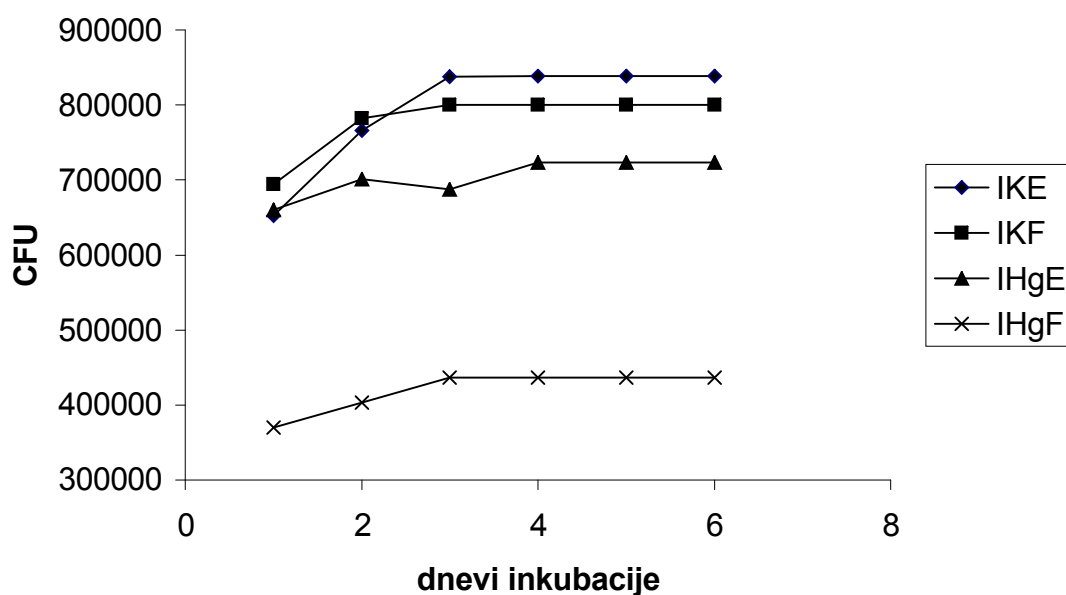
Združba živali iz Idrije je že pred prehranjevalnim poskusom kazala večji delež bakterij odpornih na Hg, kakor pri živalih iz neonesnaženega okolja (Radleka). Po prehranjevalnem poskusu je ta delež, v praznih črevesih izpostavljene skupine, ostal nespremenjen. Pri kontrolni skupini pa smo opazili padec CFU. Delež bakterij odpornih na živo srebro se je v polnih črevesih izpostavljene skupine, povečal za 7 %. V polnih črevesih kontrolne skupine smo ugotovili 6 % padec bakterij odpornih na Hg.

Raznolikost združbe, ocenjena na osnovi morfologije kolonij, je bila manjša na selektivnih ploščah NAHg, kakor na neselektivnih NA ploščah, tako pred kot po prehranjevalnem poskusu. Iz NA plošč, vzorcev pred prehranjevalnim poskusom smo izolirali 11 različnih kolonij, iz NAHg plošč pa 6 različnih kolonij.

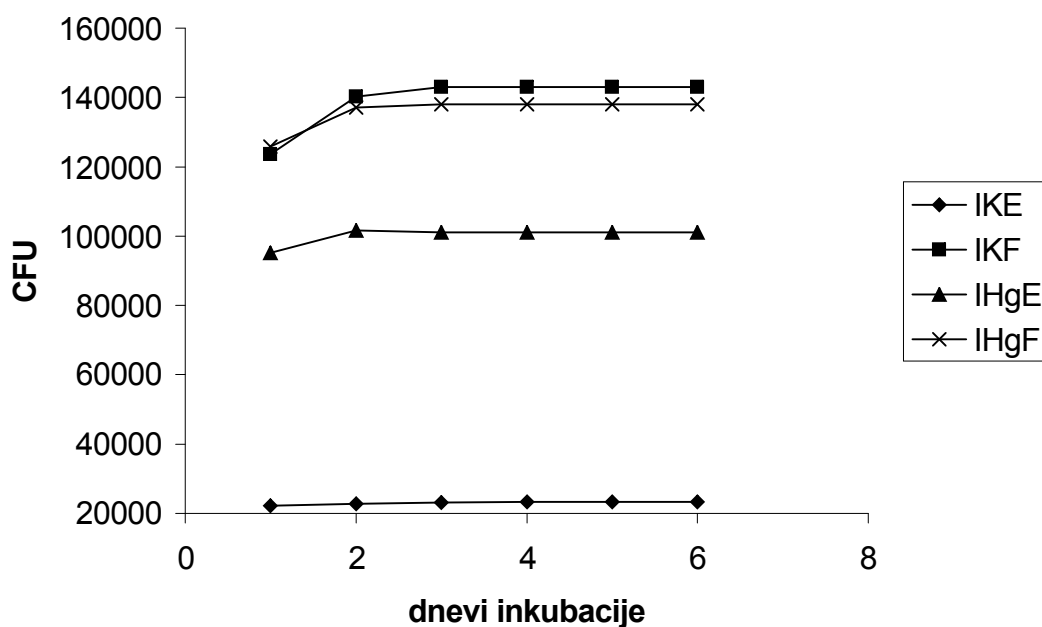
Tudi po prehranjevalnem poskusu smo, na osnovi izgleda kolonij, opazili kolonije s podobno morfologijo kakor pred poskusom. Večina kolonij se je pojavila že prvi ali drugi dan inkubacije, nato se je njihovo število povečevalo zelo počasi (slika 4.9., slika 4.10., slika 4.11., slika 4.12.). Po drugem oziroma tretjem dnevu smo opazili rast gliv, ki pa so z daljšanjem inkubacije postopoma prerasle celotno ploščo. Plošče smo inkubirali 6 do 7 dni. Glive so rasle na neselektivnih NA in selektivnih NAHg ploščah. Iz NAHg plošč smo, do posameznih kolonij, izolirali 7 različnih kolonij.

Preglednica 4.2. Primerjava vrednosti CFU iz polnih in praznih čreves *P. scaber* nabranih na Radleku in v Idriji pred in po spomladanskem prehranjevalnim poskusom (K – kontrolna skupina, Hg – izpostavljena skupina, NA – trdna gojišča brez Hg, NAHg – trdna gojišča z Hg, IK – Idrija kontrolna skupina, RK – Radlek kontrolna skupina)

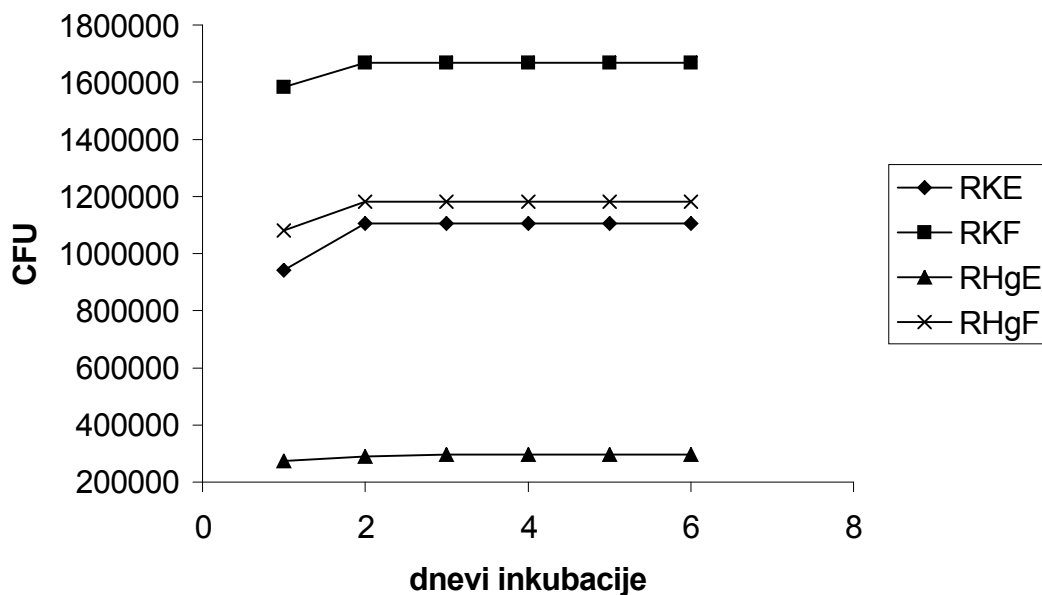
vzorec	lokacija	CFU				
PRED POSKUSOM		NA	NAHg	NAHg/NA (%)	razmerje % CFU na NAHg RK	razmerje % CFU na NAHg IK
prazno črevo						
	Radlek	87 000	182	0,21	1	
	Idrija	268 994	38 630	14,36	69	
	Radlek	1 216 450	1400	0,12	1	
	Idrija	254 167	61 200	24,08	209	
PO POSKUSU						
	Radlek K	1 105 455	0	0,000		
	Radlek Hg	296 970	133	0,045		
	Idrija K	838 788	23 273	2,77		1
	Idrija Hg	723 333	101 015	13,97		5
	Radlek K	1 667 879	67	0,004	1	
	Radlek Hg	1 182 121	1 067	0,090	22,5	
	Idrija K	800 000	143 030	17,88	4450	1
	Idrija Hg	436 364	138 061	31,64	7876	1,8



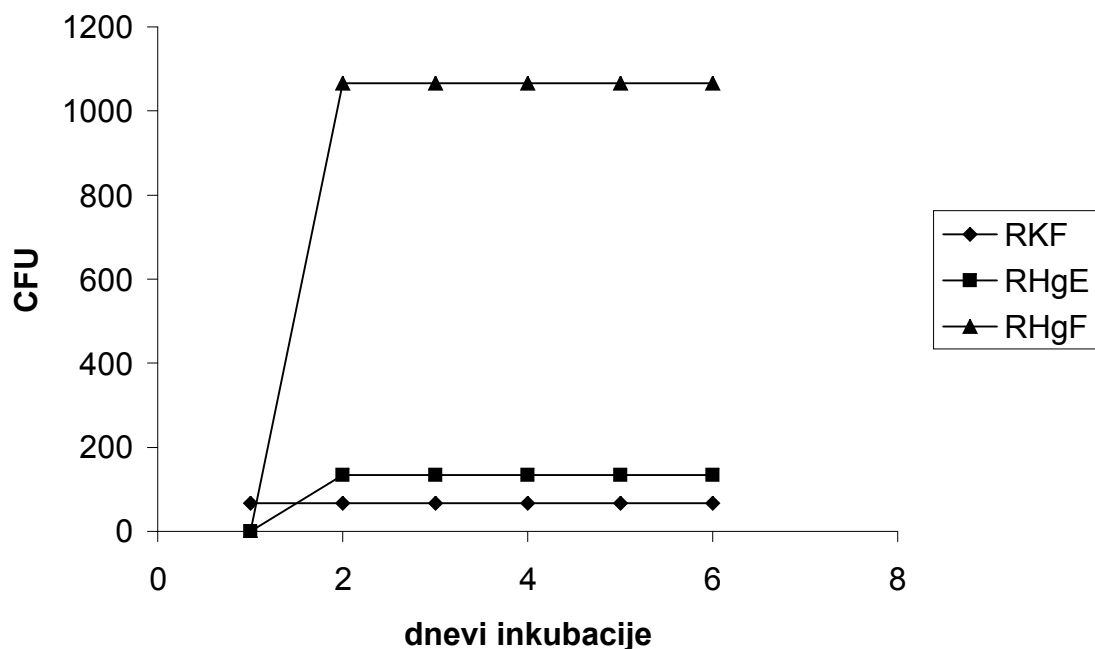
Slika 4.9. Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves *P. scaber* kontrolnih in izpostavljenih skupin iz onesnaženega okolja (Idrija) na ploščah brez Hg (NA) po dnevih inkubacije plošč



Slika 4.10. Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves *P. scaber* kontrolnih in izpostavljenih skupin iz onesnaženega okolja (Idrija) na ploščah z Hg (NAHg) po dnevih inkubacije plošč



Slika 4.11. Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves *P. scaber* kontrolnih in izpostavljenih skupin iz neonesnaženega okolja (Radlek) na ploščah brez Hg (NA) po dnevih inkubacije plošč



Slika 4.12. Število CFU pri vzorcih polnih in praznih čreves *P. scaber* kontrolnih in izpostavljenih skupin iz neonesnaženega okolja (Radlek) na ploščah z Hg (NAHg) po dnevih inkubacije plošč

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V svetu je zaznati nepričakovano povečanje koncentracij kovin v okolju, ki je posledica antropogenih vplivov. Zato je zelo pomembno kako celoten ekosistem, vključno z mikroorganizmi, odgovarja na povišane koncentracije kovin. Akutna onesnaženja s kovinami vplivajo na mikrobne združbe drugače kot kronična (Müller in sod., 2001A; Müller in sod., 2001B). Problem pri ugotavljanju vpliva kroničnih in akutnih izpostavitvev je spremenljivost pogojev v kopenskih sistemih. Nasprotno pa so v črevesih rakov enakonožcev zelo konstantne fizikalno kemijske razmere, zato smo jih uporabili kot modelni sistem. Zanimalo nas je kako akutna laboratorijska izpostavljenost živali živemu srebru, vpliva na spremembo njihove mikrobne združbe črevesa. Živali so bile nabrane v neonesnaženem okolju (Radlek) in v okolju kronično onesnaženem z živim srebrom (Idrija). Spremembo združbe smo ugotavljali z molekularnimi in gojitvenimi tehnikami.

5.1.1 Prehranjevalni poskus z živim srebrom

Prehranjevalni poskus v laboratoriju smo izvedli dvakrat: jeseni in spomladi. Zanimalo nas je ali prihaja do vidnih prehranjevalnih razlik med kontrolnimi in izpostavljenimi skupinami živali iz obeh okolij. Gojitev živali v kontroliranih laboratorijskih razmerah je za vse skupine živali predstavljalo stres. To se je pokazalo v upadu prehranjevalne aktivnosti in poginu nekaterih živali, zlasti iz skupine živali iz Idrije, od začetka do konca poskusa. Spomladanske živali so bile bolj občutljive na spremembo okolja, saj so imele manjšo stopnjo preživetja, kakor jesenske živali. Dodaten stres je predstavljala laboratorijska izpostavitvev živali živemu srebru (v koncentraciji 10 µg Hg /g suhe teže lista), kar se je pokazalo v večjem upadu prehranjevanja pri izpostavljenih skupinah kakor pri kontrolnih. Pri živalih iz neonesnaženega okolja je bil ta upad izrazitejši, kakor pri živalih iz onesnaženega okolja (kjer statistično ni bilo razlik med izpostavljeno in kontrolno skupino). Rezultati potrjujejo domnevo, da so živali iz Idrije že prilagojene na

prisotnost živega srebra v okolju, zato le-ta ne pomeni dodatnega stresa za živali. Vzrok za višji nivo prehranjevanja je lahko že predhodno prilagojena mikrobna združba v črevesu živali, ki ob prisotnosti Hg ohranja svojo funkcijo razgradnje hrane. Funkcija neprilagojene mikrobne združbe (pri živalih iz neonesnaženega okolja) se ob prisotnosti Hg zmanjša, kar pa tudi vpliva na nivo prehranjevanja.

10 µg Hg /g suhe teže lista je nizka koncentracija v primerjavi s koncentracijo živega srebra v Idriji (na mestu vzorčenja živali je koncentracija 263 µg Hg /g organskega sloja). Predhodno so bile opravljene raziskave (Lapanje, 2005) prehranjevalnega poskusa s koncentracijo 5 µg Hg/g suhe teže lista. Vendar ker se predvideva, da naj bi bil selekcijski pritisk na mikroorganizme 8 µg Hg /g suhe teže ustrezen, smo v diplomski nalogi uporabili koncentracijo 10 µg Hg /g suhe teže. Predvidevamo namreč, da se nekaj živega srebra tekom poskusa izgubi, nekaj pa ga žival ne prevzame. Tako bi dosegli dovolj veliko količino Hg, da bi delovala selektivno na odporne in neodporne bakterije.

5.1.2 Raznolikost bakterijskih populacij določena z metodo TTGE

Raznolikost bakterijske združbe v prebavilu rakov enakonožcev smo določevali z molekularno metodo TTGE. Metoda je dokaj enostavna in optimizirana za določevanje profila genov za 16S rRNK mikrobne združbe črevesa (Lapanje, 2005). Njena prednost je, da lahko z nadaljnimi natančnejšimi analizami dobljenega profila, ugotavljamo filogenetske podobnosti in razlike med posameznimi združbami. Vendar nam da metoda dokaj grobo sliko o profilu molekularne raznolikosti bakterij v vzorcih.

Profile združb smo ugotavljali pri jesenskih živalih. Individualnih razlik med združbo v prebavilih nismo opazovali, temveč je profil združbe predstavljal povprečni profil vseh uporabljenih čreves znotraj ene skupine. Predvidevamo pa, da so si prazna črevesa posameznih živali podobna, medtem ko bi pri polnih črevesih pričakovali večjo individualno raznolikost. Lapanje (2005) je že pokazal razlike črevesnih bakterijskih združb živali nabranih v okoljih onesnaženih s težkimi kovinami (Idrija, Žerjav,

Podljubelj) in v neonesnaženih okoljih (Radlek, Bovec). Prav tako so bile pokazane razlike med TTGE profili bakterijskih združb polnih in praznih čreves. Tudi združbe polnega črevesa in hrane so se med seboj razlikovale; verjetno zaradi selektivnosti okolja znotraj črevesa, razgradnje določenih skupin bakterij ali pa zaradi selektivnega prehranjevanja živali.

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti ali se bo bakterijska združba v črevesu po 14-dnevnem prehranjevalnem poskusu akutnega onesnaženja s Hg spremenila in ali bo TTGE dovolj natančna metoda, da bomo to spremembo zaznali. Pričakovali smo namreč manjše spremembe združbe pri izpostavljenih živalih iz Idrije (zaradi predhodne prilagojenosti mikrobne združbe) in večje spremembe pri izpostavljenih živalih iz Radleka (neprilagojena združba). Kontrolne – neizpostavljene skupine so nam služile za primerjavo spremembe združbe. Zelo izrazite so bile razlike TTGE profilov združb kontrolnih živali iz obeh okolij. Nekateri fragmenti so bili prisotni le pri vzorcih iz Idrije, verjetno so ti predstavniki odporni na Hg in so se v takem okolju namnožili. Pri vzorcih iz neonesnaženega okolja teh fragmentov ni, saj ni prisotnih bakterij odpornih na Hg ali pa so prisotni v tako nizkem številu, da jih s TTGE metodo nismo zaznali. Tudi UPGMA dendrogram profilov je pokazal ločeno grupiranje črevesne združbe živali iz Idrije in Radleka. Življenjsko okolje živali torej močno vpliva na sestavo črevesne mikrobne združbe. V našem primeru to pomeni prilagoditev združbe na povišane koncentracije Hg z ohranitvijo določenih vrst in propadom drugih vrst. V združbah izpostavljene skupine iz neonesnaženega okolja smo zaznali nov fragment, ki ga v kontrolni skupini in v vzorcih iz onesnaženega okolja ni bilo. Ker sta bila hrana in okolje za vse skupine enaka, predvidevamo da gre za vrsto, ki je sicer sposobna rasti v okolju z višjimi koncentracijami Hg in se je ob akutni izpostavljenosti Hg namnožila. Ker te skupine pri vzorcih živali iz Idrije ni več zaznati predvidevamo, da je bila 14-dnevna akutna izpostavitve Hg prekratek čas, da bi zaznali močne spremembe v sestavi mikrobne združbe.

Naši rezultati TTGE profilov polnih in praznih čreves živali iz obeh okolij, so prav tako pokazali razlike v mikrobni združbi. S primerjavo profila polnih in praznih čreves lahko ločimo mikoorganizme, ki so sposobni poselitve prebavila in tiste, ki so le predhodno v črevesu in pridejo s hrano v gostitelja. Pri vzorcih polnih čreves, je bilo prisotnih večje

število fragmentov, kakor pri praznih črevesih. Polna črevesa vsebujejo namreč še delce hrane pomešane z bakterijami, zaradi obilice hranil pa se bakterije lahko tudi bolj namnožijo. V praznih črevesih je hranil manj, zato je številčnost bakterij manjša. Toda natančnejša analiza profilov je pokazala ločeno grupiranje čreves glede na lokacijo in ne glede na polna in prazna črevesa. Sklepamo lahko, da so razlike mnogo bolj izrazite pri združbah iz različnih okolij kakor pri polnih/praznih črevesih znotraj istega okolja. Možno je tudi, da so prazna črevesa vsebovala še delce hrane, ali pa so bile bakterije v združbi polnih čreves pod mejo detekcije z metodo TTGE in sprememb nismo zaznali.

Med seboj se razlikujejo tudi profili med združbami fecesov, vzeti po 2., 6. in 14. dnevu prehranjevalnega poskusa. Struktura bakterijske združbe se je tekom poskusa spreminjala, kar pomeni da je Hg vplivalo selektivno na bakterije. Izginotje fragmentov pomeni propad neodpornih bakterij, nastanek novih pa bodisi namnožitev že prej obsotoječih bakterij, ki pa so bile, pred poskusom, pod mejo detekcije ali namnožitev novih bakterij privzetih s hrano. Možen je tudi prenos genov za odpornost na Hg in s tem povečanje števila odpornih bakterij. Tudi UPGMA dendrogram je pokazal ločeno grupiranje združbe v iztrebkih vzeti po 2. in 14. dnevu poskusa.

5.1.3 Število kulturabilnih heterotrofnih bakterij določeno z metodo CFU

Za določevanje števila kulturabilnih bakterij v črevesih smo uporabili živali spomladanskega vzorčenja. Z metodo CFU (»Colony Forming Unit«) smo ugotavljali razmerje med bakterijami, sposobnimi rasti na trdnem gojišču brez dodanega Hg (NA) in na selektivnem gojišču z dodanim živim srebrom (NAHg). Metoda temelji na predpostavki, da je vsaka bakterijska celica, v ustreznem okolju in pogojih, sposobna tvoriti vidno kolonijo na trdnem gojišču. Plošče smo inkubirali do 6 dni. Slabost te metode je v tem, da je potrebna velika pazljivost in natančnost pri pripravi redčitev, saj že najmanjša napaka lahko zelo spremeni rezultate. Poleg tega, je delež kulturabilnih bakterij v okolju zelo nizek, zato so klasične mikrobiološke gojitvene metode pomankljive. So pa večinoma edina možnost za ugotavljanje števila bakterij odpornih proti določeni snovi,

zato je njihova uporaba še danes zelo pogosta (Müller in sod., 2001A; Müller in sod., 2001B; Müller in sod., 2001C; Ellis in sod., 2001; Lapanje, 2005)

Število kulturabilnih bakterij smo določevali, pred in po prehranjevalnem poskusu, pri živalih iz obeh lokacij. Število pred poskusom nam pove začetno stanje in je referenca za določitev spremembe združbe po prehranjevalnem poskusu. Ločeno smo uporabili tako polna kot prazna črevesa. Število bakterij na gojišču brez Hg je bilo pri vzrocih iz Radleka, po pričakovanjih, večje pri vzorcih polnih čreves, kakor praznih. Delež na Hg odpornih bakterij je bil pri praznih in polnih črevesih zelo nizek (0,21 % pri praznih in 0,12 % pri polnih). To kaže na zelo nizek delež odpornih bakterij v črevesju živali iz neonesnaženega okolja, saj ni selekcijskega pritiska, ki bi njihov delež povečal. Izmerjena koncentracija živega srebra na mestu vzorčenja je bila 0,194 µg Hg/g organskega sloja zato sklepamo, da je to vzrok za prisotnost tudi na Hg odpornih bakterij. Število kulturabilnih bakterij vzorcev iz Idrije je bilo, pri praznih in polnih črevesih, približno enako. Število odpornih bakterij pri polnih in praznih črevesih je bilo mnogo višje kakor pri živalih iz Radleka (polna črevesa so imela delež rezistence 24 %, prazna pa 14 %). Polna črevesa vsebujejo namreč hrano pomešano z bakterijami, zaradi obilice hranil pa se bakterije v takem okolju tudi močno namnožijo. Začetno stanje je torej pokazalo, da je črevesna združba pri živalih iz Idrije res bolj prilagojena na živo srebro. Izračun razmerja deleža CFU obeh lokacij je pokazal, da je bilo pri praznih črevesih iz Idrije število odpornih bakterij 69 krat večje glede na črevesa živali iz Radleka. Pri polnih črevesih je bilo to razmerje 209.

Pričakovali smo, da bo 14-dnevna akutna izpostavljenost Hg povzročila spremembo bakterijske združbe pri živalih iz neonesnaženega okolja. Kontrolna skupina pa bi ohranila približno enako razmerje, kakor pred poskusom. Pri praznih in polnih črevesih se delež odpornih bakterij ni spremenil tako pri izpostavljeni, kot pri kontrolni skupini. Število kulturabilnih bakterij na gojišču brez Hg, se je ohranilo pri vseh skupinah, razen pri praznih črevesih izpostavljene skupine. Tako pri polnih kot pri praznih črevesih, pa se je število vseh kulturabilnih bakterij vzorcev iz neonesnaženega okolja, zmanjšal pri izpostavljeni skupini glede na kontrolno. Sklepamo lahko, da je živo srebro sicer delovalo negativno na neodporne bakterije, vendar je bil čas izpostavitve Hg prekratek, da bi se

odpornost razširila na večje število bakterij. Zato smo lahko zaznali padec števila kulturabilnih bakterij in ohranitev deleža bakterij odpornih na Hg.

Pri vzorcih živali iz Idrije so se po prehranjevalnem poskusu, deleži nekoliko spremenili. Pri kontrolni skupini s praznimi črevesi smo opazili padec deleža odpornih bakterij, a večje število vseh kulturabilnih bakterij. Odsotnost živega srebra je lahko povzročila upad odpornih bakterij, saj ni bilo več prisotnega selekcijskega pritiska. Izpostavljena skupina s praznimi črevesi je ohranila delež odpornih bakterij in povečala število vseh kulturabilnih. Ohranitev deleža je v skladu s pričakovanji, saj živo srebro nima vpliva na že predhodno prilagojeno združbo. Pri polnih črevesih kontrolne in izpostavljene skupine, se je delež odpornih bakterij po prehranjevalnem poskusu še povečal. V polnem črevesu je veliko hranilnih snovi, ki omogočajo dobro rast bakterij, zato se le-te številčno bolj namnožijo, kakor v praznih črevesih. Poleg tega so verjetno tudi pogoji ugodni za prenos genskih determinant odpornosti na Hg. Razmerje deleža CFU glede na primere iz Radleka se je tudi zelo povečalo (iz začetnih 209 na končnih 4450 pri kontrolni skupini in 7876 pri izpostavljeni skupini). To kaže na velik porast odpornih bakterij pri predhodno že adaptirani mikrobni združbi.

Raznolikost združbe, ocenjena na osnovi morfologije kolonij, je bila manjša na selektivnih ploščah s Hg, kakor na ploščah brez Hg, tako pred kot po prehranjevalnem poskusu. Hg namreč omogoča rast le odpornim bakterijam, medtem ko plošče brez Hg omogočajo rast širokemu spektru bakterij (s tem pa opazimo tudi večjo raznolikost kolonij). Večina kolonij se je pojavila že prvi oziroma drugi dan inkubacije, nato se je njihovo število povečevalo zelo počasi. To je v skladu s predvidevanji Rasmussen in Sørensen (2001), ki poročata o spremembi združbe iz K-strategistov v r-strategiste pod vplivom stresa. Po drugem oziroma tretjem dnevu smo opazili rast gliv, ki pa so z daljšanjem inkubacije postopoma prerasle celotno ploščo. Zanimivo je, da so glive rasle tako na gojiščih brez Hg, kakor na gojiščih s Hg pri vzorcih iz Idrije in Radleka. Sklepamo lahko, da Hg v koncentraciji 8,4 µg/ml gojišča ne deluje selektivno na rast gliv.

5.2 SKLEPI

- prehranjevalni in vitro poskus je za vse skupine živali predstavljal stres
- upad prehranjevanja izpostavljenih Idrijskih živali je bil manjši kakor upad prehranjevanja izpostavljenih živali iz neonesnaženega okolja
- strukture mikrobni združb čreves živali iz neonesnaženega in onesnaženega okolja, določena s TTGE profiliranjem 16S rDNK, se razlikujejo
- gojitvene tehnike so pokazale povečano število in diverziteto kulturabilnih bakterij, odpornih na Hg, pri mikroflori čreves živali iz onesnaženega kraja
- 14-dnevna akutna izpostavitve Hg v prehranjevalnem poskusu se je izkazala za prekratko dobo, da bi bil z gojitvenimi metodami viden znaten porast deleža bakterij odpornih na živo srebro pri predhodno neprilagojeni mikrobni združbi. Z molekularnimi metodami smo zaznali pojav novih skupin bakterij po koncu prehranjevalnega poskusa.
- pri predhodno že prilagojeni združbi se je delež odpornih kulturabilnih bakterij po akutni izpostavitvi še povečal

6 POVZETEK

Živo srebro (Hg) je kovina, ki je toksična v že zelo majhnih koncentracijah. Toksičnost živega srebra za organizme je odvisna od njegove biološke dostopnosti. V naravi je lahko v obliki slabo topnega in s tem slabo biološko dostopnega minerala HgS. Ostale oblike Hg (Hg^0 , Hg^{2+} , metil-Hg (Met-Hg), dimetil-Hg (Met-Hg-Met)) so topne in s tem dostopne za biološko transformacijo med različnimi oksidativnimi stanji. Nekateri mikroorganizmi so razvili mehanizme odpornosti na živo srebro, ki temeljijo na transformacijah Hg (metilacija Hg^{2+} , demetilacija CH_3Hg^+ (Met-Hg), redukcija Hg^{2+} in oksidacija Hg^0). Zato imajo ti mikroorganizmi pri kroženju Hg v naravi zelo pomembno vlogo.

Antropogeni vir Hg predstavlja kar 75 % globalnega vnosa Hg v okolje in biosfero. Idrija je industrijsko mesto v Sloveniji z drugim največjim rudnikom živega srebra v Evropi, katerega delo je bilo zaustavljeno v začetku leta 1996. V času 500-letnega delovanja rudnika in topilnic je bilo v okolje sproščenega 37 000 t Hg. Do današnjega dne ostajajo problem območja z nakopičenimi žgalniškimi ostanki, ker predstavljajo osnovne vire emisij Hg. Koncentracije Hg v tleh na območju Idrije so močno povišane, zato nam Idrija predstavlja odlično vzorčno mesto za raziskovanje vpliva dolgotrajnega onesnaženja s kovinami na ekosistem.

Kopenski rak enakonožec *P. scaber* je eden izmed najboljše proučevanih organizmov v kopenski ekotoksikologiji. Ustrezna velikost, številčnost, enostavnost za ravnanje v laboratoriju in sposobnost akumulacije kovin, uvrščajo te živali med zelo uporabne organizme za biomonitoring okolja onesnaženega s kovinami. Pomembna lastnost je, da lahko tolerira visoke koncentracije težkih kovin. Bakterijska mikroflora prebavila je za rake enakonožce izredno pomembna, saj jim omogoča ustrezno izrabo hranil. Večino črevesne bakterijske mikroflore predstavljajo fakultativno anaerobne bakterije, v manjši meri pa tudi striktni anaerobi. Združba mikroorganizmov je na okolje, v katerem živi, prilagojena. Obremenitev s kovino lahko združbo mikroorganizmov spremeni, kar se odraža v spremenjenem delovanju živali, vplivu na mineralizacijo organskega materiala in

posledično na kroženje snovi v naravi. Spremenjena združba lahko vsebuje skupine bakterij, ki sodelujejo pri pretvorbah nekaterih kovin (npr.: Hg). Tako je znano da sulfat reducirajoče bakterije (SRB) metilirajo Hg in s tem povečajo njegovo toksičnost. Po drugi strani pa razne skupine odpornih bakterij pretvarjajo Hg v hlapno obliko ter tako zmanjšajo obremenitev okolja.

V raziskavah smo ugotavljali vpliv kratkotrajne (akutne) izpostavljenosti živemu srebru na

(i) spremembo bakterijske združbe čreves *P. scaber* in

(ii) prehranjevalni odziv živali *P. scaber*

Rake enakonožce smo nabrali v kraju s povišanimi koncentracijami Hg (Idrija) in v kraju, kjer ni bilo rudarjenja ali druge industrije (Radlek). Po 14-dnevem laboratorijskem poskusu akutne izpostavljenosti Hg (v koncentraciji 10 µg Hg/g suhe teže hrane) smo z molekularnimi in gojitvenimi metodami ugotavljali vpliv živega srebra na črevesno mikrobno združbo živali iz obeh okolij.

S TTGE profiliranjem genov za 16S rRNK smo pokazali razlike med sestavo mikrobnih združb živali iz obeh okolij, kar kaže na prilagoditev mikrobne združbe razmeram v okolju živali (seleksijski pritisk zaradi kronične izpostavljenosti Hg v Idriji). Gojitvene tehnike so pokazale, da je delež bakterij odpornih na Hg mnogo večji pri vzorcih iz Idrije, kakor pri vzorcih iz neonesnaženega okolja v Radleku.

14-dnevna akutna laboratorijska izpostavitve Hg v prehranjevalnem poskusu se je izkazala za prekratko dobo, da bi bil z gojitvenimi metodami viden izrazit porast deleža Hg-odpornih bakterij pri predhodno neprilagojeni mikrobni združbi. Pri predhodno že prilagojeni združbi se je delež odpornih bakterij po akutni izpostavitvi še povečal. Z metodo TTGE profiliranja 16S rRNK smo po koncu prehranjevalnega poskusa zaznali spremembe v mikrobni združbi. Pri izpostavljeni skupini iz neonesnaženega okolja smo zaznali nove fragmente, za katere predvidevamo, da pripadajo skupini bakterij odpornih na Hg.

6 SUMMARY

Mercury (Hg) is a metal which is toxic in very small quantities. Toxicity of mercury for organisms depends on its bioavailability. One of the low toxic forms is HgS, which has also low water solubility and is therefore less bioavailable than other forms. Other forms of mercury (Hg^0 , Hg^{2+} , methyl-Hg (Met-Hg), dimethyl-Hg (Met-Hg-Met)) are soluble and readily available for biological transformations. Namely, microorganisms with Hg-resistance mechanisms have a very important role in mercury cycling in nature.

Idrija as industrial city in Slovenia, had the second biggest mercury mine in Europe. The mine was closed in the year 1996. During the 500-years of mining 37 000 t of Hg was released in the environment. These residues represent a major source of Hg contamination, therefore Hg concentrations in the soil of Idrija are still high. For this reason Idrija qualifies as a good site for studying the long-term impact of mercury pollution on the environment.

Isopod *P. scaber* is one of the most studied organisms in terrestrial ecotoxicology and was also used in our experiment. Additional reason for using this isopod in our study was also its significant ecological role, its ability to survive in polluted environments, and the comprehensive knowledge of its biology. Isopod-gut bacterial microflora interactions are very important for degradation of nutrients. Most of the bacterial microflora in the gut represent facultative anaerobic bacteria and a smaller part are obligatory anaerobs. Microbial community is adapted to the environment. Metall pollution can change the structure of the microbial community. The changes in microbial community could also effect its physiology and have consequences on the bioavailability of metals in the environment. The sulfate reducing bacteria are well known methylators of mercury. Methylation increases toxicity of the metal. Several other groups of bacteria, involved in mercury volatilisation and detoxification, could be also present.

We investigated the effect of the short-term metal pollution on:

- (1) the bacterial gut microflora of *P. scaber*
- (2) feeding response of the animal *P. scaber*

Isopods were collected in the environment, which was chronically polluted with mercury (Idrija), and in unpolluted environment (Radlek), with no previous reports on industrial activities. After 14-days of experimental exposure to mercury (10 µg Hg/g dry weight of food) we investigated the community level bacterial response with use of molecular and culturable methods.

The results of TTGE 16S rRNA profiling showed diversity of profiles between samples from both environments (chronically polluted and unpolluted). This shows that community is adapted to the different conditions in the environment. The culturable approach showed the highest proportion of Hg-resistant bacteria in the gut of the animals taken from chronically polluted environment when compared to the gut of the animals from Radlek.

Culturable method did not show significant increase in Hg-resistant bacteria after 14-days of Hg-exposure in previously non-adapted microbial community (samples taken in Radlek). In previously adapted microbial communities from guts of the animals collected in Idrija, the increase of Hg resistant phenotypes was observed. We speculate that a period of 14 days is too short for acquiring and spreading resistance to mercury in the microbial community, which can be detected by culturable method. TTGE 16S rRNA profiling showed new groups of bacteria in previously not adapted bacterial community. At the same time this was not detected in any other samples. Therefore we speculate, that this bacteria are Hg-resistant, but after additional time they become overgrown by other resistant bacteria.

7 VIRI

Alikhan M.A. 1969. The physiology of the woodlouse, *Porcellio laevis* Latreille (Porcellionidae, Peracarida). I. Studies on the gut epithelium cytology and its relation to the maltase secretion. Canadian Journal of Zoology, 47: 65-75

Atlas R. M., Horowitz A., Krichevsky M., Bej A. K. 1991. Response of microbial populations to environmental disturbance. Microbial Ecology, 22: 249-256

Baldi F., Pepi M., Filippelli M. 1993. Methylmercury resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* strains in relation to methylmercury degradation. Applied and Environmental Microbiology, 59: 2479-2485

Barkay T. 1987. Adaptation of aquatic microbial communities to Hg^{2+} stress. Applied and Environmental Microbiology, 53,12: 2725-2732

Barkay T., Miller S.M., Summers A.O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiology Reviews, 779: 1-30

Berg R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. Trends in Microbiology, 4: 430-435

Berg D.E., Akopyants N.S., Kersulyte D. 1994. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5,1: 13-24

Bignell D.E. 1984. The arthropod gut as an environment for microorganisms. V: Invertebrate – Microbial interactions. Anderson J.M. (ed.). Cambridge, Cambridge University Press: 205-227

Boening D.W. 2000. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. Chemosphere, 40: 1335-1351

Brune A. 1998. Termite gut: the world's smallest bioreactor. Trends in Biotechnology, 16: 16-21

Clarkson T.W. 2002. The three modern faces of mercury. Environmental Health Perspectives, 110, 1: 11-23

Clifford B., Witkus E. R. 1971. The fine structure of the hepatopancreas of the woodlouse, *Oniscus asellus*. Journal of Morphology, 135: 335-350

Compeau G., Bartha R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of Hg in anoxic estuarine sediments. Applied and Environmental Microbiology, 50: 498-502

Coruzzi L., Witkus R., Vernon G. M. 1982. Function-related structural characters and their modifications in the hindgut epithelium of two terrestrial isopods, *Armadillidium vulgare* and *Oniscus asellus*. *Experimental Cell Biology*, 50: 229-240

De A.K., Sen A.K., Modak D.P., Jana S. 1985. Studies of toxic effects of Mercury II on *Pistia stratiotes*. *Water, Air nad Soil Pollution*, 24: 351-360

Dillon R.J., Dillon V.M. 2004. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. *Annual Review of Entomology*, 49: 71-92

Drobne D., Rupnik M., Lapanje A., Štrus J., Janc M. 2002. Isopod gut microflora parameters as endpoints in toxicity studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 604-609

Drobne D. 1997. Terrestrial isopods—a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1159-1164

Duxbury T. 1985. Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms. V: *Advances in microbial ecology*. Marshal K.C. (ed.). New York, Plenum Press: 185-235

Ellis R.J., Neish B., Trett M.W., Bets J.G., Weightman A.J., Morgan P., Fry J.C. 2001. Comparison of microbial and meiofaunal community analysis for determining impact of heavy metal contamination. *Journal of Microbiological Methods*, 45: 171-185

Forstergaard A., Tunlid A., Baath E. 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biology and Biochemistry*, 28: 55-63

Green C.T., Scow K.M. 2000. Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology Journal*, 8, 1: 126-141

Gnamuš A. 2002. Živo srebro v kopenski prehranski verigi. Ljubljana, Inštitut Jožef Štefan: 266 str.

Gnamuš A., Horvat M. 1999. Mercury in terrestrial food webs of the Idrija mining area. V: *Mercury contaminated sites: characterization, risk assessment, and remediation*. Ebinghaus R., Turner R. R., Lacerda L. D. D., Vasilliev O., Salomons W. (eds.). Berlin, Springer: 281-317

Hartenstein R. 1964. Feeding, digestion, glycogen, and the environmental conditions of the digestive system in *Oniscus asellus*. *Journal of Insect Physiology*, 10: 611-621

Hassall M., Jennings J.B. 1975. Adaptive features of gut structure and digestive physiology in the terrestrial isopod *Philoscia muscorum* (Scopoli) 1763. *Biological Bulletin*, 149: 348-364

Hayashi K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods and Applications, 1, 1: 8-34

Hattori H. 1992. Influence of heavy metals on soil microbial activities. Soil Science and Plant Nutrition, 38: 93-100

Hines M.E., Horvat M., Faganeli J., Bonzongo J.C., Barkay T., Major E.B. Scott K.J., Bailey E.A., Warwick J.J., Lyons W.B. 2000. Mercury biogeochemistry in the Idrija river, Slovenia, from above the mine into the Gulf of Trieste. Environmental Research, 83, 2: 129-139

Horvat M., Covelli S., Faganeli J., Logar M., Mandic V., Rajar R., Sirca A., Zagar D. 1999. Mercury in contaminated coastal environments; a case study: the Gulf of Trieste. Science of the Total Environment, 237-238: 43-56

Hopkin S.P., Hardisty G.N., Martin M.H. 1986. The woodlouse *Porcellio scaber* as a 'biological indicator' of zinc, cadmium, lead and copper pollution. Environmental Pollution, 11: 271-290

Hopkin S.P. 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. London, Elsevier Applied Science: 366 str.

Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Bleeker M., Vos P., Zabeau M., Kersters K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology, 142: 1881-1893

Jorgensen J., Dolan S., Haselton A. Kolchinsky R. 1997. Isolation and cultivation of sporeforming filamentous bacteria from *Porcellio scaber*. Canadian Journal of Microbiology, 43: 129-135

King J.K., Saunders F.M., Lee R.F., Jahnke R.A. 1999. Coupling mercury methylation rates to sulfate reduction rates in marine sediments. Environmental Toxicology and Chemistry, 18: 1362-1369

Kostanjšek R., Štrus J., Avguštin G. 2002. Genetic diversity of bacteria associated with hindgut of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). FEMS Microbiology Ecology, 40: 171-179

Kostanjšek R., Lapanje A., Rupnik M., Štrus J., Drobne D., Avguštin G. 2004. Anaerobic bacteria in the gut of terrestrial isopod crustacean *Porcellio scaber*. Folia Microbiologica, 49: 179-182

Kozdroj J., van Elsas J.D. 2001. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. Applied Soil Ecology, 17: 31-42

Lane R. 1988. The digestive system of *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Isopoda, Oniscoidea): Histology and histochemistry. *Crustaceana*, 55: 113-128

Lapanje A. 2000. Sulfat reducirajoče bakterije v prebavilu mokrice *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 59str.

Lapanje A. 2005. Vpliv onesnaženosti z živim srebrom na vrstno raznolikost bakterij v prebavilih enakonožnih rakov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 164str.

Lindqvist L., Block M., Tjalve H. 1995. Distribution and excretion of Cd, mercury, methyl-mercury and Zn in the predatory beetle *Pterostichus niger*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 1195-1201

Lizama H.M., Sankey B.M. 1993. Conversion of hydrogen sulphide by acidophilic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40: 438-441

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

Miller D. N., Bryant J. E., Madsen E. L., Ghiorse W. C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4715-4724

Moore P.D. 1983. Ecological diversity and stress. *Nature*, 306: 17

Müller A.K., Wastergaard K., Christensen S., Sørensen S.J. 2001A. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 11-19

Müller A.K., Rasmussen L.D., Sørensen S.J. 2001B. Adaptation of the bacterial community to mercury contamination. *FEMS Microbiology Letters*, 204: 49-53

Müller A.K., Westergaard K., Christensen S., Sørensen S.J. 2001C. The diversity and function of soil microbial communities exposed to different disturbances. *Microbial Ecology*, 44: 49-58

Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141

Nataraj A.J., Olivos-Glander I., Kusukawa N., Hoghsmith Jr. W.E. 1998. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis*, 20, 6: 1177-1185

Nazaret S., Brothier E., Ranjard L. 2003. Shifts in diversity and microscale distribution of the adapted bacterial phenotypes due to Hg(II) spiking in sSoil. *Microbial Ecology*, 45, 3: 259-269

Nolde N., Jereb V., Drobne D., Horvat M. 2004. The fate of Hg in terrestrial isopod *Porcellio scaber* and its environment. *Materials and Geoenvironment*, 51, 2: 1264-1267

Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178: 5636-5643

Oremland R.S., Culbertson C.W., Winfrey M.R. 1991. Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1: 130-137.

Pak K.R., Bartha R. 1998A. Mercury methylation by interspecies hydrogen and acetate transfer between sulfidogens and methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1987-1990

Pak K.R., Bartha R. 1998B. Mercury methylation and demethylation in anoxic lake sediments and by strictly anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3: 1013-1017

Petersen D. G., Dahllöf I., Nielsen L. P. 2003. Effects of zinc pyrithione and copper pyrithione on microbial community function and structure in sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 921-928

Ranjard L., Richaume A., Jocteur-Monrozier L., Nazaret S. 1997. Response of soil bacteria to Hg(II) in relation to soil characteristics and cell location. *FEMS Microbiology Ecology*, 24: 321-331

Ranjard L., Brothier E., Nazaret S. 2000. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 12: 5334-5339

Rasmussen L. D., Sørensen S. J. 2001. Effects of mercury contamination on the culturable heterotrophic, functional and genetic diversity of the bacterial community on soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 1-9

Robinson J.B., Tuovinen O.H. 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: Physiological, biochemical and genetic analysis. *Microbiological Reviews*, 48: 95-124

Rykiel E.J. Jr. 1985. Towards a definition of ecological disturbance. *Australian Journal of Ecology*, 10: 361-365

Sandaa R.A., Torsvic V., Enger O. 2001. Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 287-295

Savage D.C. 1987. Factors involved in colonization of the gut epithelial surface. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31: 131-135

Schutter M.E., Dick R.P. 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Science Society of America Journal*, 64: 1659-1668

Silver S. 1996. Bacterial resistance to metal ions – a review. *Gene*, 179: 9-19

Silver S. 1998. Genes for all metals – a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom award lecture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20: 1-12

Smith T., Pitts K., McGarvey J.A., Summers A.O. 1998. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg(0). *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1328-1332

Summers A. O. 1978. Microbial transformations of metals. *Annual Reviews in Microbiology*, 32: 637- 672

Štrus J., Drobne D., Lièar P. 1995. Comparative anatomy and functional aspects of the digestive system in amphibious and terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). V: *Terrestrial isopod biology*. Alikhan M. A. (ed.). Rotterdam, A.A. Balkema: 15-23

Tiedje J.M., Asumnig-Brempong S., Nusslein K., Marsh T.L., Flynn S.J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13, 2: 109-122

Uesbeck M., Topp W. 1995. The effect of leaf litter, microorganisms and colembola on the food allocation of *Oniscus asellus* (Isopoda). V: *Terrestrial isopod biology*. Alikhan M. A. (ed.). Rotterdam, AA Balkema: 121-132

Viaud M., Pasquier A., Bry Y. 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR–RFLP of ITS. *Mycological Research*, 104: 1027-1032

Wang Y., Stingl U., Anton-Erxleben F., Zimmer M., Brune A. 2004. „*Candidatus Hepatincola porcellionum*“ gen. nov., sp. nov., a new, stalk-forming lineage of Rickettsiales colonizing the midgut glands of a terrestrial isopod. *Archives in Microbiology*, 181: 299-304

Warburg M. R., Rosenberg M. 1989. Ultracytochemical identification of Na⁺, K⁺-ATPase activity in the isopodan hindgut epithelium. *Journal of Crustacean Biology*, 9: 525-528

Weast R.C. 1989. *Handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data*. Cleveland, CRC Press: 224str.

Wieser W. 1966. Cooper and the role of isopods in degradation of organic matter. *Science*, 153: 67-69

Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51: 221-271

Wood J.M. 1984. Alkylation of metals and the activity of metal-alkyls. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7: 229-240

Wood S., Griffiths B.S. 1988. Bacteria associated with the hepatopancreas of the woodlice *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *Pedobiologia*, 31: 89-94

Zimmer M., Brume A. 2005. Physiological properties of the gut lumen of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): adaptive to digesting lignocellulose? *Journal of Comparative Physiology*, 175: 275-283

Zimmer M., Topp W. 1997. Homeostatic responses in the gut of *Porcellio scaber* (Isopoda: Oniscidea) optimize litter degradation. *Journal of Comparative Physiology*, 167: 582-585

Zimmer M. 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary ecological approach. *Biology Reviews*, 77: 455-493

Zimmer M., Topp W. 1998. Do woodlice (Isopoda: Oniscidea) produce endogenous cellulases? *Biology and Fertility of Soils*, 26: 155-156

ZAHVALA

Največja zahvala gre dr. Alešu Lapanjetu za vso pomoč in potrpežljivost pri laboratorijskem delu, botanične nasvete, za usmerjanje pri pisanju diplomske naloge in za čas, ki smo ga tako ali drugače preživeli skupaj.

Hvala mentorici prof. dr. Nini Gunde Cimerman in somentorici prof. dr. Damjani Drobne za nasvete in spodbudo pri pisanju diplomske naloge. Prav tako se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Jasni Štrus za temeljiti pregled diplomske naloge.

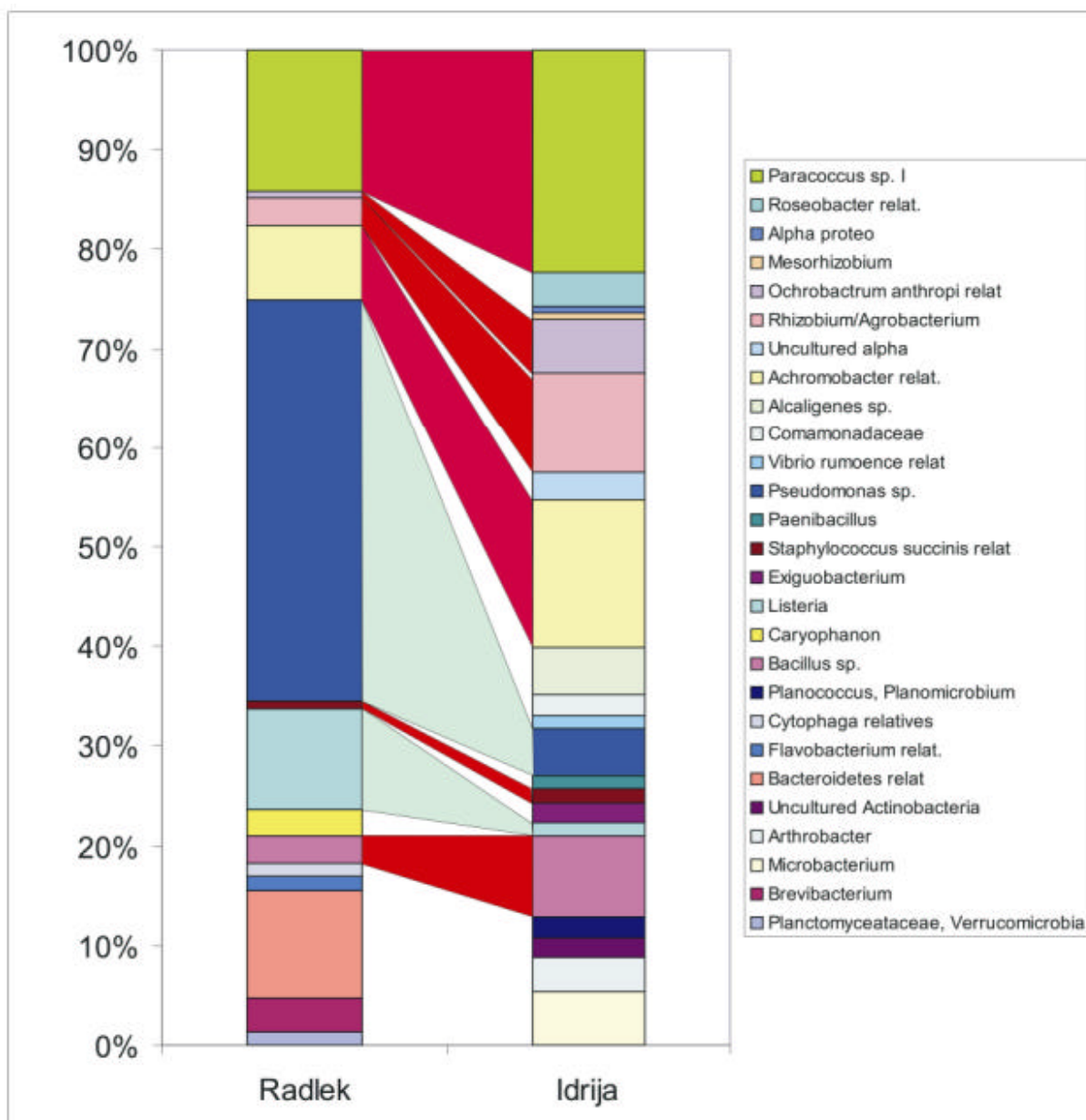
Hvala vsem ostalim sodelavcem Katedre za biologijo mikroorganizmov in Katedre za splošno zoologijo za pomoč pri delu v laboratoriju.

Velika zahvala gre tudi gospe Darji Pitako za vso pomoč pri reševanju vseh administrativnih težav.

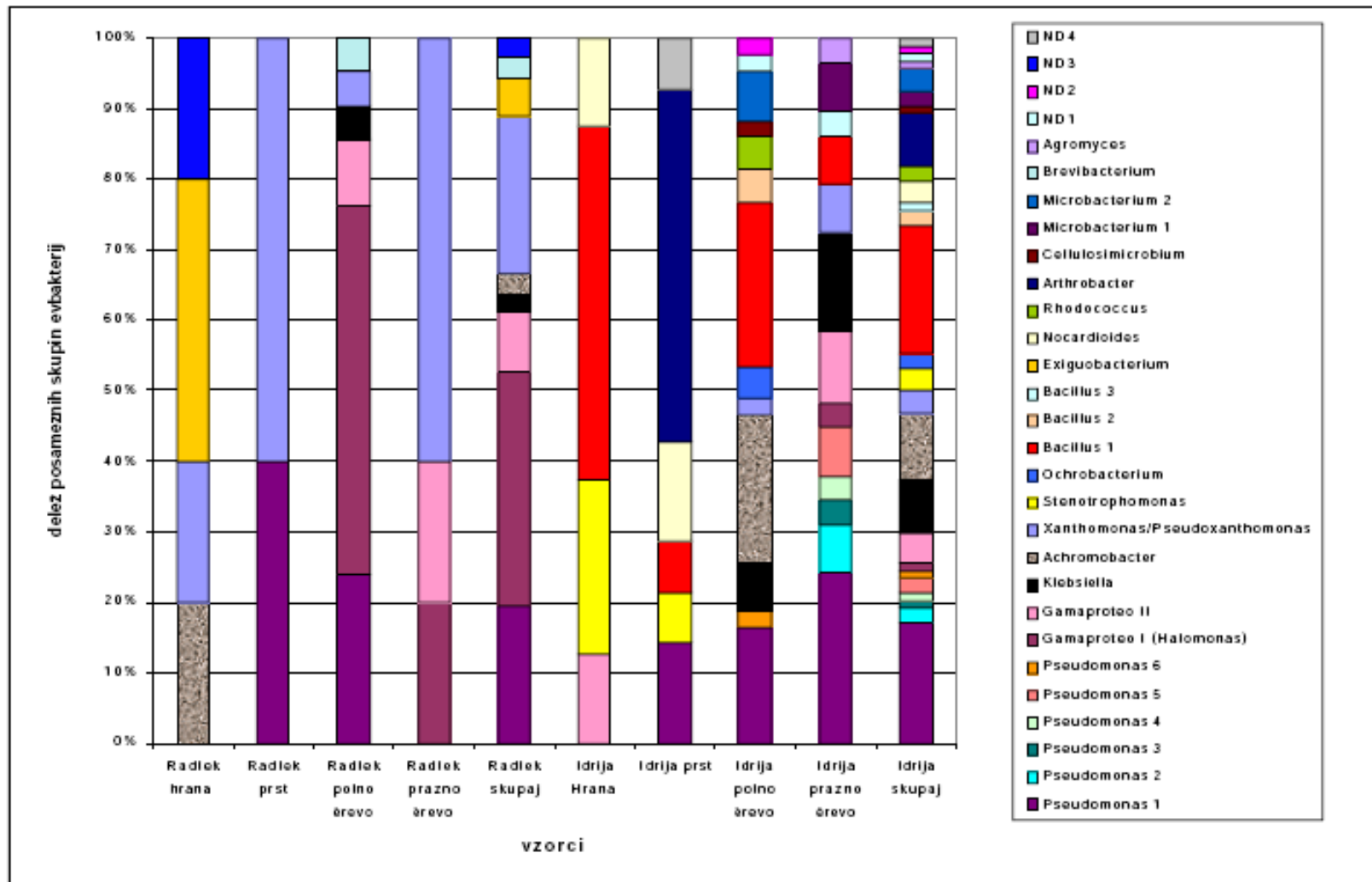
Hvala Andražu za spodbudne besede v težkih trenutkih in seveda za vso tehnično podporo pri pisanju naloge. Prav tako zahvala Petri za družbo in pomoč v laboratoriju.

In še na koncu hvala staršema in sestri za spodbudo in podporo tekom študija.

PRILOGE



Priloga A: Prikaz deleža bakterijskih skupin v klonskih knjižnicah iz DNK praznih čreves *P. scaber* nabranih na Radleku (neonesnaženo okolje) in v Idriji (onesnaženo okolje). Z rdečo so prikazane skupine, ki se povečajo v onesnaženem kraju in z modro tiste, ki se zmanjšajo (Lapanje, 2005)



Priloga B: Prikaz deležev bakterijskih skupin Hg tolerantnih bakterijskih izolatov iz čreves *P.scaber* nabranih na Radleku in Idriji (Lapanje, 2005)

Priloga C: Ocena bogatosti vrst v vzorcih praznih čreves živali *P. scaber* nabranih v Idriji in Radleku (Lapanje, 2005)

