



Slika 20: Če voda najde pot po razpokah, peščenjak prepereva samo vzdolž njih in po površini. Tudi ta primer je z obzidja Ljubljanskega gradu. Foto: Matevž Novak.

Dodatni viri:

- Chamley, H., 1990: *Sedimentology*. Berlin: Springer-Verlag, 285 str.
- Gregorač, V., 1995: *Mali leksikon geologije*. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije, 359 str.
- Novak, M., 2016: *Geološki sprehod po Ljubljani – naravni kamen v kulturnih znamenitostih*. Ljubljana: Mestna občina Ljubljana, Oddelek za varstvo okolja, 38 str.
- Pettijohn, F. J., 1957: *Sedimentary rocks*. 2. izdaja. New York: Harper & Row Publishers, 718 str.
- Pavšič, J., 1999: *Življenjsko vrtinčenje*. GEA, 9 (1): 23.
- Pavšič, J., in Mikuž, V., 2000: *Vodna tehnica*. GEA, 10 (9): 47-48.

- Ramovš, A., 2002: *Spodnjetriasni pisani kremenov peščenjak – nov okrasni kamen v Ljubljani*. Proteus 65 (1): 40-41.
- Ramovš, A., 2000: *Podpeški in črni ter pisani lesnobraški apnenec skozi čas*. Ljubljana: Mineral, 115 str.
- Ramovš, A., 2005: *Kaj so kokarde in kako nastanejo*. Proteus, 67 (8): 369.
- Roberts, J. L., 1996: *The Macmillan field guide to geological structures*. London: Macmillan Press, 250 str.
- Stow, D. A. V., 2009: *Sedimentary rocks in the field: A color guide*. 3. izdaja. Academic Press, 320 str.

Uporabnost metode na osnovi DNA za razlikovanje med cianobakterijami • Bakteriologija in genetika

Uporabnost metode na osnovi DNA za razlikovanje med cianobakterijami

Evgenija Burger, Lucija Marzel Djuranovič in Luka Petravič

Cianobakterije so najstarejši fotosintetski mikroorganizmi. Z ekološkega vidika so zelo pomembne, zato je poznavanje prisotnosti cianobakterij v okoljskih vodah ključno za razumevanje naravne flore, ki nas obdaja. Ker je lahko klasična morfološka analiza za določevanje vrst zavajajoča, smo se odločili oceniti uporabnost molekularnih metod za razlikovanje cianobakterij.

Kaj so cianobakterije?

Cianobakterije so predhodnice zelenih alg, ki so pred 2,3 milijarde let s fotosintezo omogočile razvoj današnjega ozračja. Najdemo jih skoraj v vseh vrstah življenjskih prostorov, tudi v skrajno neprijaznih razmerah (na primer v vročih vrelcih, na polarnih območjih ...). Ob povečani vsebnosti hranilnih snovi v vodi se cianobakterije močno

namnožijo. Pojav imenujemo cvetenje voda in ima lahko katastrofalni vpliv na okolje. Cvetenje pomeni ekološki problem za vse v vodi živeče organizme, saj se za aerobni razkroj odmrlih cianobakterijskih cvetov porabljajo velike količine kisika, tega pa posledično primanjkuje ostalim vodnim organizmom, kar vodi do njihovega pogina. Različni cianobakterijski cvetovi se pojavljajo od poletja do zime. Cvetenja sposobne cianobakterije lahko izločajo cianotoksine. Ti sodijo med najmočnejše človeku poznane strupe, ki so nevarni tudi za njegovo zdravje. Vrednost LD₅₀ enega izmed najmočnejših cianotoksinov je 8 mikrogramov na kilogram telesne mase, medtem ko je vrednost LD₅₀ za modrasov toksin na primer 21 mikrogramov na kilogram telesne mase. V Braziliji je leta 1993 zaradi kopičenja cianotoksinov zdravniško pomoč iskalo približno dva tisoč ljudi, umrlo pa jih je 88.

Pojav cvetenja voda je v Sloveniji najbolj poznan na Blejskem jezeru, kjer je močno prisotna cianobakterijska vrsta *Planktothrix rubescens*. Cvetenje je opazno kot rdeče-vijolični film na gladini jezera, kjer se cianobakterije zadržujejo, saj jim izpostavljenost svetlobi omogoča učinkovitejšo fotosintezo.

Prepoznavanje cianobakterij

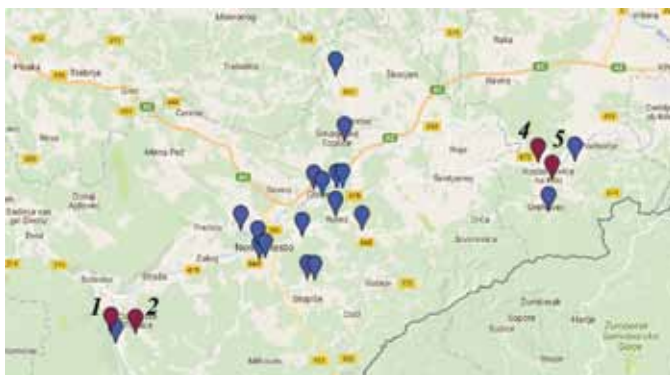
Cianobakterije so velike od 0,2 mikrometra do 200 mikrometrov, zato se pri njihovem prepoznavanju strokovnjaki opirajo predvsem na mikroskopsko analizo glede na njihov videz, vendar pa so si lahko cianobakterije pod mikroskopom, sploh svetlobnim, zelo podobne. Za dovolj veliko natančnost potrebujemo zelo zmogljiv mikroskop, analiza pa zahteva

Prikaz mest vzorčenja na Dolenjskem. Z rdečo so označeni vzorci, katerim smo določili nukleotidno zaporedje, z modro pa še vsi ostali (vzorec 3 je bil odvzet iz akvarija).

veliko znanja in izkušenj. Ker pa je natančno prepoznavanje cianobakterij pomembno ne le zaradi vse večje onesnaženosti vodnih teles in posledično obsežnih cianobakterijskih cvetov, ampak tudi zaradi njihove rastoče priljubljenosti v biotehnoški uporabi, se metode prepoznavanja preusmerjajo v uporabo natančnejših molekularnih metod. Med njimi je najpomembnejša analiza nukleotidnih zaporedij, ki predstavlja obetavno alternativo za prepoznavanje, saj se nukleotidna zaporedja na nekaterih delih kromosomov dovolj razlikujejo, da lahko na podlagi zaporedja ugotovimo, kateremu organizmu zaporedje pripada. Zaradi opisane problematike smo se tudi sami usmerili v raziskovanje uporabne vrednosti tovrstnih molekularnih metod, ki bi omogočale zanesljivejše prepoznavanje cianobakterij. Pri tem smo se osredotočili na kromosomski regiji 16 S (standardna regija za genotipsko analizo) in ITS-1, ki je še bolj raznolika in omogoča razlikovanje med sevi iste vrste. Ta regija namreč nima pomembne vloge pri preživetju cianobakterij, zato se je v evoluciji hitreje spreminjala. Molekularno analizo opravimo s pomnoževanjem izbranih genomskih regij z metodo PCR, čemur pogosto sledi analiza dolžine restrikcijskih fragmentov, lahko pa določimo tudi nukleotidna zaporedja.

Postopek dela

Želeli smo analizirati okoljske vode, zato smo delo pričeli z odvzemom vzorcev iz vodnih teles predvsem na območju Dolenjske



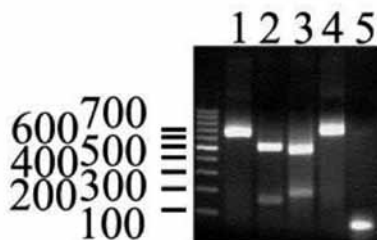
(okolica Novega mesta, Dolenjskih Toplic ter Kostanjevice na Krki), pa tudi na območju osrednje Slovenije (Koseški bajer) in Blejskega jezera. Vzorce smo po odvzemu shranili v temen in hladen prostor. Pri tem smo si prizadevali, da smo jih v čim krajšem času prefiltrirali in zbrane celice do uporabe zamrznili. Sledila je izolacija DNA. Ker nismo v strokovni literaturi zasledili nobenega protokola, ki bi bil hkrati varen, učinkovit in dovolj preprost za izvedbo v osnovno opremljenem laboratoriju, smo ga pripravili sami. Posvetili smo se predvsem liziranju celic, saj ima to največji vpliv na uspešnost izolacije. Primerjali smo štiri različne načine liziranja (razbijanje z ultrazvokom, zamrzovanje in odtajanje, razbijanje s steklenimi kroglicami ter izolacija s komercialnim kompletom reagentov).

Po določitvi najboljšega načina liziranja smo izbrano metodo uporabili na okoljskih vzorcih. Dobili smo celične lizate, iz njih pa z ekstrakcijo in obarjanjem izolirali DNA. Z metodo PCR smo pomnožili izbrane odseke DNA, pri čemer smo uporabili začetne oligonukleotide, ki naj bi bili specifični za cianobakterije. Amplikone smo nato analizirali z elektroforezo na agaroznem gelu in restrikcijsko analizo. Amplikonom smo določili nukleotidno zaporedje: iz gela smo izolirali pomnoženo DNA – tako smo bili prepričani o vsebnosti DNA ustrežne dolžine za nadaljnje raziskave - in jo vstavili v plazmid, tega pa v bakterijske celice *Escherichia coli*. Bakterije s plazmidom smo namnožili, iz njih izolirali plazmide in jih poslali na analizo. Dobljena zaporedja smo primerjali z zbirko podatkov s spletnim programom BLAST, ki primerja dobljena nukleotidna zaporedja z največjo svetovno zbirko znanih zaporedij.

Rezultati

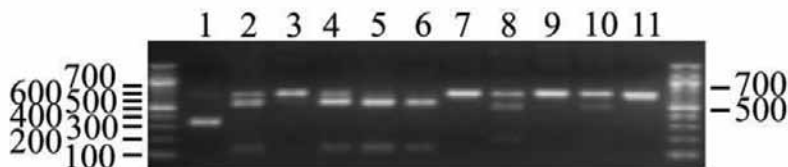
Pri izolaciji DNA se je kot najbolj uspešen pokazal komercialni komplet reagentov, vendar smo se odločili, da kljub temu uporabimo steklene kroglice, saj so te cenejše,

hkrati pa primerljivo učinkovite kot komplet reagentov. Na uspešnost smo sklepali iz količine produkta po PCR. Ustrezali sta tako množina DNA kot tudi kakovost, saj vemo, da je encim, ki ga uporabimo v reakciji PCR, zelo občutljiv za prisotnost nečistoč. Restrikcijsko analizo produktov PCR smo izvedli z encimi *EcoRI*, *NcoI*, *BclI* in *KpnI*. Najprej smo DNA, ki smo jo izolirali iz laboratorijskega seva *Synechocystis* sp. PCC 6803 in okoljskega vzorca cianobakterije *Planktothrix rubescens*, razrezali z encimoma *BclI* in *NcoI*. Za ti dve cianobakteriji je nukleotidno zaporedje znano, zato je bilo z bioinformatičnim orodjem mogoče določiti pričakovane velikosti produktov po rezanju. Poskus je pokazal, da sta oba encima delovala ter da so produkti pričakovanih velikosti.



Restrikcijska analiza Synechocystis sp. PCC6803 in vzorca številka 6, odvzetega na Bledu. Vzorci: standard velikosti, (1) BclI – Synechocystis sp. PCC6803, (2) NcoI – Synechocystis sp. PCC 6803, (3) BclI – vzorec iz Blejskega jezera, (4) NcoI – vzorec iz Blejskega jezera, (5) negativna kontrola.

V nadaljevanju smo analizirali amplikone iz nekaterih ostalih okoljskih vzorcev, pri katerih restrikcijske slike ni bilo mogoče predvideti. Ugotovili smo, da so vzorci vsebovali različne pomnožene segmente DNA in da je torej z restrikcijsko analizo mogoče razlikovati med vzorci. Nekateri vzorci so kazali, da so lahko vsebovali DNA iz več organizmov – to vidimo po več fragmentih



Restriksijska analiza DNA 16 S, pomnožene v okoljskih vzorcih. Vzorci: standard velikosti, (1) KpnI – vzorec 2, (2) EcoRI – vzorec 3, (3) EcoRI – vzorec 1, (4) EcoRI – vzorec 5, (5) EcoRI – vzorec 4, (6) EcoRI – vzorec 2, (7) BclI – vzorec 5, (8) BclI – vzorec 2, (9) BclI – vzorec 3, (10) BclI – vzorec 1, (11) BclI – vzorec 4.

DNA pri nekaterih vzorcih na sliki zgoraj; pri dolžini približno 600 bp je nerazrezen ampikon, pri manjših dolžinah pa so restriksijski fragmenti, ki so nastali po uspešni restrikciji dela ampikona (enota *bp* pomeni *bazni par* in je standard za navajanje dolžine nukleotidnih zaporedij).

Nukleotidno zaporedje smo določili šestim okoljskim vzorcem, ki so za območje Dolenjske označeni na zemljevidu. Pri vzorcu 6, za katerega smo pričakovali, da je *Plankthotrix*, saj je na površini vode bilo videti cianobakterijski cvet, je bilo nukleotidno zaporedje 16 S identično zaporedjem cianobakterij *Plankthotrix rubescens*, izoliranih v različnih delih sveta. Pri petih vzorcih, za katere ni bilo mogoče vnaprej ugotoviti, katere mikroorganizme so vsebovali, pa smo ugotovili različno sestavo. Dva vzorca sta vsebovala DNA cianobakterij, ki so sorodne predstavnikom iz rodu *Synechocystis*, *Synechococcus* in *Leptolyngbya* oziroma iz rodu *Oscillatoriales*. Pri enem vzorcu smo pomnožili kloroplastno DNA ene od višjih rastlin, vendar pa zaradi ujemanja z veliko vnosi v zbirki nismo mogli določiti vrste, pri več vzorcih pa tudi kloroplastno DNA iz alg.

Kot smo ugotovili že pri restriksijski analizi, je tudi analiza nukleotidnih zaporedij pokazala, da je v vzorcih prisotna DNA več organizmov. Povsem natančne določitve vrste v večini primerov ni bilo mogoče opraviti, saj so zbirke nukleotidnih zaporedij nepopolne. Hkrati smo ugotovili, da lahko

začetni oligonukleotidi, ki naj bi bili specifični za cianobakterije, vsaj v nekaterih primerih pomnožujejo tudi kloroplastno DNA in torej niso specifični za cianobakterije. To niti ni tako presenetljivo, saj vemo, da so se kloroplasti najverjetneje razvili iz simbiot-
skih cianobakterij.

Prihodnost prepoznavanja cianobakterij z DNA

Ravnanje s toksičnimi cianobakterijami, ki so nevarne tako za okolje kot za človeka in živali, zahteva odgovorne in predvsem ustrezne varnostne ukrepe, kar pa je mogoče le, če smo prepričani o identiteti organizmov, s katerimi imamo opraviti. Določanje cianobakterij na podlagi njihovih nukleotidnih zaporedij nam bo v prihodnje omogočalo pridobitev zanesljivejših podatkov o prisotnosti določenih cianobakterij ter pestrosti organizmov v okolju. Okoljske raziskave bo mogoče razširiti na področje natančnejšega poznavanja združb v vodnih ekosistemih, kar vključuje spremljanje raznolikosti v vegetacijskem obdobju.

Glede na izsledke našega dela lahko trdimo, da je v prihodnosti na področju uporabe nukleotidnih zaporedij DNA pri prepoznavanju cianobakterij še veliko prostora za napredek. Do polne izrabe molekularnih metod bo trajalo še nekaj let. Predvsem bo treba povečati zbirke nukleotidnih zaporedij tako za zaporedje kromosomske regije ITS-1 kakor tudi kromosomske regije 16 S, saj so te trenutno pomanjkljive.

Če bi analize opravljali z restrikcijsko analizo, bi bilo mogoče pripraviti ustrezna računalniška orodja, ki bi nam olajšala delo, zato bi bioinformatično orodje omogočilo hitrejšo delo in približalo metodo več uporabnikom. Poleg tega bo še veliko let vzporedno z razvojem teh postopkov treba izvajati monitoring, ki bo temeljil na klasičnih pristopih, kot so preverjanje neoporečnosti virov pitne vode, spremljanje navzočnosti cianobakterij v okolju ter ozaveščanje javnosti o pomenu in nevarnostih cvetenja vod.

Slovar:

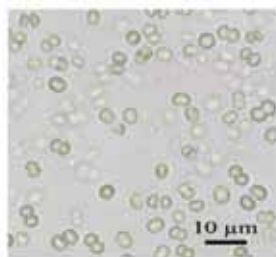
AGE. Agarozna gelska elektroforeza: metoda za ločevanje DNA v električnem polju.

Fitoplankton. Majhni rastlinski organizmi, ki prosto lebdi v vodi.

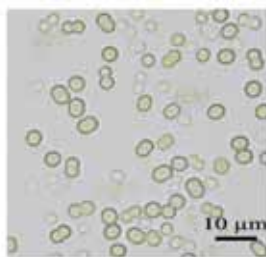
Amplikon. Pomnoženi fragment DNA z metodo PCR.

BLAST. Bioinformatično orodje za poravnavo DNA. Orodje primerja dobljena nukleotidna zaporedja z največjo svetovno zbirko znanih zaporedij.

1. Morfološka primerjava cianobakterij



Microcystis aeruginosa



Synechocystis aquatilis

Mikroskopska slika cianobakterij

Microcystis aeruginosa in

Synechocystis aquatilis.

Avtorica: Mojca Juteršek.

Samo na podlagi velikosti in oblike celic bi sklepali, da je na obeh slikah predstavljena cianobakterija iste vrste. Vendar pa je na desni sliki tipična vrsta cianobakterije iz rodu *Synechocystis*, ki ne izloča toksinov, na levi pa cianobakterija iz rodu *Microcystis*, ki proizvaja toksin mikrocistin. Če bi določali vrsto cianobakterij samo na podlagi morfoloških značilnosti, bi se lahko zgodilo, da bi nevarno cianobakterijo napačno določili kot nenevarno (in obratno).

2. Operon *rrn*

Za prepoznavanje cianobakterij na podlagi njihovih nukleotidnih zaporedij potrebujemo ustrezno genomsko regijo, ki se med predstavniki posameznih rodov in vrst dovolj razlikuje. V literaturi sta kot primerni navedeni regiji 16 S in ITS-1 na operonu *rrn*. Ta zapisuje za molekule rRNA (16 S, 5 S, 23 S), ki gradijo ribosome, na katerih se sintetizirajo proteini. Poleg že omenjenih regij pa operon sestavljata še dve regiji notranjega prepisanega vmesnika (ITS-1, ITS-2), ki ne zapisujeta za molekule rRNA. Razlike v regiji 16 S so tako majhne, da že samo triodstotna razlika v poravnavi kaže, da smo analizirali predstavnike različnih vrst. Zato je ta predel za prepoznavanje cianobakterij manj uporaben kot regiji ITS, ki sta zaradi odsotnosti evoliucijske vloge bolj raznoliki – mutacija v tem delu genoma ne povzroči smrti organizma.



Shematski prikaz sestave operona rrn. Avtor: Klemen Kapš, za potrebe piscev prispevka.

LD₅₀. Količina snovi, ki povzroči smrt petdeset odstotkov populacije.

PCR. Verižna reakcija s polimerazo, ki omogoča kopiranje odsekov DNA.

Plazmid. Nekromosomski krožni genetski element v bakterijski citoplazmi.

Restriksijska analiza. Rezanje molekul DNA z encimi in analiza dobljenih dolžin produktov.

Restriksijske endonukleaze. Encimi, ki razrežejo DNA na točno določenih mestih.

Restriksijski fragment. Fragment DNA, ki je nastal po rezanju z restriksijsko endonukleazo.

rRNA. Ribosomska RNA; pri bakterijah ribosom sestavljajo tri različne rRNA in približno petdeset proteinov.



Od leve proti desni: prof. dr. Marko Dolinar, Mojca Juteršek, Lucija Marzel Djuranovič, Evgenija Burger, Tanja Gačnik in Luka Petravič (osebni arhiv).

Evgenija, Lucija in Luka so dijaki Gimnazije Novo mesto. V prihodnosti se vidijo v naravoslovju: Evgenija si želi študirati matematiko, Lucija in Luka pa bi svoje izobraževanje rada nadaljevala na medicinski fakulteti. Kljub skupnemu navdušenju nad naravoslovjem pa se mladi raziskovalci v prostem času ukvarjajo tudi s taborništvom in športom ter se učijo tujih jezikov in prav to pripomore k razgledani, vedoželjni in usklajeni raziskovalni ekipi, v kateri vsak prispeva velik delež svojega znanja. Če bi povzeli mnenja vseh treh, bi lahko rekli, da je raziskovalno delo kljub naporom in vsemu vložnemu trudu predvsem zanimivo in izjemno bogato s poučnimi vsebinami, ki širijo njihovo splošno razgledanost.

Arheobotanika • Velika podvodnica (Najas marina) na Ljubljanskem barju

Velika podvodnica (*Najas marina*) na Ljubljanskem barju že v četrtem tisočletju pred našim štetjem

Tjaša Tolar, Branko Vreš

Arheološke raziskave kolišč na Ljubljanskem barju danes dosledno vključujejo tudi biološke raziskave, to je raziskave arheostankov rastlin in živali, ki so se ohranili v tako imenovanih sedimentih kulturnih plasti. Ob odkritju novega kolišča med načrtovane raziskave vključimo tudi izpiranje sedimenta iz kulturnih plasti na sitih z najmanjšim

premerom odprtin 0,355 milimetra. Ves material s sit natančno pregledamo in s pomočjo stereomikroskopa izločimo vse prepoznavne biološke ostanke. Med rastlinskimi ostanki so to najpogostejše cela semena in plodovi ali njihovi deli, pa tudi ostanki lesa, oglja, mahov, listov in iglic ter žitnih plev. Na ta način pridobljeni in odkriti rastlin-