

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 90, številka 2
Volume 90, Number 2

Acta agriculturae Slovenica, 90(december 2007)2

Acta agriculturae Slovenica

Izdaja	Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana. Letno izhajata dva letnika vsak z dvema številka.
Glavni in odgovorni urednik	prof. dr. Peter DOVČ
Tehnični urednik	Jože STOPAR
Uredniški odbor	prof. dr. Tajana ČERNY (Zagreb), akad. prof. dr. Remzi BAKALLI (Athens, ZDA), prof. dr. Zdenko PUHAN (Zürich), dr. Michel BONNEAU (Saint Gilles), prof. dr.dr.h.c. Franz PIRCHNER (Innsbruck), prof. dr. Jasna M.A. STEKAR (Ljubljana), dr. Drago BABNIK (Ljubljana), prof. dr. Jernej TURK (Maribor), izr.prof. dr. Dejan ŠKORJANC (Maribor), doc. dr. Slavica GOLC TEGER (Ljubljana), izr.prof. dr. Milena KOVAČ (Ljubljana)
Jezikovni pregled	Vanda ŠUŠTERŠIČ
Razmnoževanje	ROTOSI d.o.o., Tomačevo 19, SI-1000 Ljubljana, v 450 izvodih
Naslov uredništva	Groblje 3, SI-1230 Domžale, tel.: 01 7217 800, telefaks: 01 7241 005
E-pošta	peter.dovc@bfro.uni-lj.si
Domača stran	http://aas.bf.uni-lj.si/
Letna naročnina	25,04 EUR, za tujino 30 EUR
Posamezna številka	16,69 EUR, za tujino 20 EUR
Imetnik računa	UL, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana
Banka	BANKA SLOVENIJE, Slovenska 35, SI-1505 Ljubljana
Račun	01100-6030707410, sklic na številko 40-521-200341
Sofinancira	Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije
Zbornik redno selektivno zajemajo	AGRIS, CAB Abstracts, COBISS in FSTA
Dokumentacijska obdelava	Mednarodna: Slovenski nacionalni center AGRIS Domača: INDOK Oddelka za zootehniko
Publikacije v zameno za Zbornik pošljite na naslov	Centralna knjižnica Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana, p.p. 2995
Avtorska pravica	© 2007 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 90

Ljubljana, december 2007

Številka 2

VSEBINA / CONTENTS

	stran page
GENETIKA / GENETICS	
Genetski nadzor inbridiranih linij Martina PERŠE, Simon HORVAT in Damjana ROZMAN	69
PREHRANA / NUTRITION	
Potek fermentacije škroba ob dodatku različnih vrst taninov Urška SIVKA in Andrej LAVRENČIČ	85
ŽIVALSKA PROIZVODNJA / ANIMAL PRODUCTION	
Problematika terminov "prostoživeče", "gojene" in "rejne" živali v slovenski zakonodaji Aleksandra ŽIGO JONOZOVIČ	97
MIKROBIOLOGIJA / MICROBIOLOGY	
Examination of AI-2 quorum sensing System in <i>Prevotella bryantii</i> and <i>Prevotella ruminicola</i>-like strains by using bioluminescence assay Gregor GORENC, Filip LUKÁŠ and Gorazd AVGUŠTIN	107
Analiza toksičnosti in genotoksičnosti jezerskih voda z biotesti Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC in Romana MARINŠEK-LOGAR	115
Evaluation of Ethiopian isolates of <i>Pseudomonas fluorescens</i> as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by <i>Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum</i> Henok KUARABACHEW, Fasil ASSEFA and Yaynu HISKIAS	125

Subject index by Agrovoc descriptors	
Tomaž BARTOL.....	137
Subject index by Agris category codes	
Nataša SIARD.....	139
Abecedno kazalo avtorjev	141
Navodila avtorjem.....	143
Notes for authors.....	145

GENETSKI NADZOR INBRIDIRANIH LINIJ

Martina PERŠE ^{a)}, Simon HORVAT ^{b)} in Damjana ROZMAN ^{c)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Medicinska fak., Inštitut za patologijo, Medicinski eksperimentalni center, Zaloška 4, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e-pošta: martina.perse@mf.uni-lj.si.

^{b)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, prof.dr., e-pošta: simon.horvat@bfro.uni-lj.si.

^{c)} Univ. v Ljubljani, Medicinska fak., Inštitut za biokemijo, Center za funkcijsko genomiko, Zaloška 4, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, prof.dr., e-pošta: damjana.rozman@mf.uni-lj.si.

Delo je prispelo 02. februarja 2007, sprejeto 26. oktobra 2007.

Received February 02, 2007, accepted October 26, 2007.

IZVLEČEK

Z razvojem molekularne genetike so postale inbridirane linije učinkovito in nepogrešljivo orodje v biomedicinskih raziskavah. Njihova uporabnost sega od raziskovanja osnovnih mehanizmov delovanja genov in genskega uravnavanja do razvoja modelov za človeške bolezni, ki so nepogrešljivi pri raziskovanju patofizioloških, biokemičnih in molekularnih mehanizmov nastanka in razvoja bolezni kot tudi pri razvijanju novih terapevtskih sredstev. Zato je povsem razumljivo, da so zahteve po uniformnih in avtentičnih živalih znotraj genetsko standardiziranih linij upravičene in s stališča verodostojnosti rezultatov nujne. Namen prispevka je opozoriti na potencialne vire genetskega razhajanja med linijami in predstaviti metode, ki se lahko uporabljajo pri genetskem nadzoru glodalcev (predvsem laboratorijskih miši in podgan) tako v vzrejni kot poskusni enotah.

Ključne besede: molekularna genetika / biomedicinske raziskave / inbridirane linije / genetska razhajanja / genetska variabilnost / genetski nadzor / genetski označevalci / genetski polimorfizmi / laboratorijske miši / laboratorijske podgane

GENETIC MONITORING OF INBRED STRAINS

ABSTRACT

With the advent of molecular genetics, inbred strains became one of the most powerful tools in biomedical research. Their applications are numerous and range from investigating basic mechanisms of genes and gene regulation to the generation of models of human diseases, which can be used for pathophysiological, biochemical, molecular and therapeutic studies. Therefore, the need for uniform and authentic animals within the genetically standardized strains is understandable and from the perspective of validity of results also necessary. The purpose of this article is to outline the potential sources of genetic variation of rodent (mainly mouse and rat) colonies and to describe the methods used to monitor or control this variation. These methodologies may be applied in both breeding centres and individual research laboratories.

Key words: molecular genetics / biomedical research / inbred strains / genetic drift / genetic variability / genetic monitoring / genetic markers / genetic polymorphisms / laboratory mice / laboratory rats

UVOD

V osemdesetih letih prejšnjega stoletja je veliko raziskovalcev poročalo o genetskem razhajanju (angl. genetic variability; genetic drift) znotraj inbridiranih linij oziroma podlinij

podgan in miši med različnimi komercialnimi rejami ali celo znotraj posamezne reje. Eden takih primerov je bila WKY inbridirana linija podgan, ki so jo raziskovalci uporabljali pri študijah povišanega krvnega tlaka in se pri tem soočali z nasprotujočimi si rezultati (Kurtz in sod., 1989). Genetske razlike so odkrili tudi pri podlinijah, ki izvirajo iz linije 129/SvJ, ki je služila kot vir pluripotentnih embrionalnih matičnih celic za razvoj miši s ciljno mutacijo (Threadgill in sod., 1997). Prav tako je prišlo do genetskega razhajanja pri kongenih linijah na C57BL/6 in DBA ozadju (Lovell in sod., 1984). Protislovne rezultate so dobili tudi raziskovalci zaradi neupoštevanja genetskih razlik med podlinijami C57BL/6 linije (Wotjak, 2003; Specht in Shoepfer, 2001). Predvideva pa se, da obstaja še veliko več primerov, kjer je genetsko razhajanje znotraj genetsko standardiziranih linij povzročilo protislovne rezultate in so zato le-ti ostali neobjavljeni.

Opisani primeri po eni strani pričajo, da znotraj izogenih linij prihaja do genetskih razhajanj, kar ima lahko negativne učinke pri vrednotenju raziskovalnih podatkov. Uporaba linij oziroma podlinij, ki niso genetsko definirane lahko vodi do nezanesljivih, celo neuporabnih rezultatov, in je pogosto vzrok za neponovljivost poskusov znotraj ali med institucijami. Po drugi strani pa ti isti primeri povdarjajo pomembnost uspešne genetske kontrole pri zagotavljanju uniformnosti in avtentičnosti genetsko standardiziranih linij.

V prispevku smo se osredotočili na genetski nadzor inbridiranih linij, ki so med genetsko standardiziranimi linijami pri znanstvenoraziskovalnem delu zastopane že od samega začetka genetskih raziskav na sesalcih. Zato ne preseneča dejstvo, da so se metode dokazovanja genetske istovetnosti razvijale v odvisnosti od zahtev uporabe inbridiranih linij (Silver, 1995). Danes so inbridirane linije med najpogostejše uporabljenimi linijami tako v imunoloških, onkoloških kot tudi v genetskih raziskavah, kjer služijo kot izvirne linije za razvoj drugih genetsko standardiziranih linij kot so koizogene, rekombinantne, kongene ter mutirane. Zato se opisane metode lahko smiselno uporabljajo pri genetskem nadzoru vseh naštetih linij.

INBRIDIRANE LINIJE IN PODLINIJE

Izraz inbridirana linija opredeljuje homozigotne osebkke, ki so parjeni v ožjem sorodstvu in so zaradi tega genetsko identični z izjemo razlik med spoloma (Ločniškar, 1999). Inbridirana linija nastane po vsaj 20 zaporednih generacijah inbridinga (brat x sestra; izjemoma starši x potomci) iz enega izvornega para (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and Rat Genome and Nomenclature Committee, 2005). Izogenost, homozigotnost in dolgoročna genetska stabilnost omogočata vzrejo in uporabo inbridiranih linij širom po svetu, neodvisno od kraja in časa. Znotraj inbridiranih linij naj bi bila genetska variabilnost minimalna, zaradi česar je tudi fenotipska variabilnost za večino lastnosti bistveno manjša kot pri genetsko variabilnih osebkkih, še posebno za lastnosti, ki so značilne za posamezno linijo (Festing, 1999). Zato lahko govorimo o za linijo značilnem fenotipu (poznana življenjska doba ter glavne patološke, imunološke, fiziološke, vedenjske in biokemične značilnosti posamezne linije). Posamezna linija je označena s kodo, ki omogoča njeno razpoznavnost širom po svetu (za podrobnejšo razlago glej (Perše in Rozman, 2006)).

Kljub vsem naštetim lastnostim prihaja med osebki znotraj inbridirane linije do genetskega razhajanja, ki ima lahko za posledico nastanek novih linij oziroma podlinij. Zato so nastala jasna pravila, ki določajo, kdaj lahko govorimo o linijah oziroma podlinijah (Festing in sod., 1999a). Če namreč ločeno vzrejamo živali iste linije med F_{20} in F_{40} oziroma katerokoli standardno inbridirano linijo za več kot 20 generacij govorimo o podliniji. V prvem primeru je v genomu inbridiranih linij še dovolj heterozigotnih lokusov, da lahko z nadaljnim inbridingom botrujejo nastanku genetsko različnih osebkov, v drugem primeru pa je zelo verjetno, da bo prišlo do genetske raznolikosti zaradi novih spontanah mutacij, ki se bodo fiksirale. Ne glede na prejšnji

dve pravili, pa govorimo o nastanku podlinije vedno, kadar se odkrije genetske razlike med živalmi znotraj linije (International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and Rat Genome and Nomenclature Committee, 2005).

GENETSKA RAZHAJANJA ZNOTRAJ INBRIDIRANIH LINIJ

Dejavniki, ki lahko vodijo do genetskih razhajanj so rezidualna heterozigotnost, kopičenje in fiksacija spontanij mutacij ter genetska kontaminacija (Sharp in sod., 2002; Zimmermann in sod., 2000; Hardy, 2004).

Rezidualna heterozigotnost

Izračunali so, da so živali po 20 zaporednih generacijah inbridinga v povprečju homozigotne na 98,6 % lokusih, medtem ko je preostali del genoma še vedno heterozigoten. Ta ostanek genetske variabilnosti imenujemo rezidualna heterozigotnost (Beck in sod., 2000; Festing, 2003; Sharp in sod., 2002; Zimmermann in sod., 2000). Čeprav se rezidualna heterozigotnost z nadaljnjim inbridingom zmanjšuje, je le-ta še vedno lahko vzrok genetskemu razhajanju. Najbolj očitno je to sicer takrat, ko pride do ločene vzreje živali znotraj linije že kmalu po njenem nastanku, kar ima za posledico nastanek novih linij. Najbolj poznani primeri nastalih linij, ki izvirajo iz iste linije, sta liniji DBA/1 in DBA/2, ki se danes genetsko razlikujeta na večjem številu lokusov zaradi relativno velike rezidualne heterozigotnosti ob času njune ločitve (Mouse Genome Database, 2006). Rezidualna heterozigotnost je tudi vzrok raznolikosti med živalmi iste linije ali podlinije, ki se vzrejajo v ločenih rejah, saj se z nenehnim inbridingom lahko na heterozigotnih lokusih pri potomcih fiksirajo alternativni aleli, ki tako vodijo v nova razhajanja znotraj linije ali podlinije. (Zimmermann in sod., 2000).

Mutacije

Do razhajanj lahko pride tudi zaradi spontanij mutacij. Nekateri avtorji poročajo, da je verjetnost fiksacije mutacije na kateremkoli delu genoma pri inbridiranih linijah zaradi homozigotnosti in izogenosti majhna in še manjša na kodirajočih ali regulatornih področjih (Festing, 2003; Sharp in sod., 2002). Drugi ocenjujejo, da pride v genomu inbridiranih linij miši do fiksacije mutacije v vsaki tretji generaciji, pri podganah pa celo pri vsaki generaciji (Zimmermann in sod., 2000). V preteklosti je opisanih kar nekaj primerov nastanka povsem novih linij zaradi spontanij mutacij. Med njimi sta danes najbolj poznani liniji debelih (mutacija »obese«, Pennisi, 2000) in golih miši (mutacija »nude«, Flanagan, 1966). In ne le to, v vodilnem laboratoriju genetskih raziskav na miših (The Jackson Laboratory) osebje pri redni oskrbi dveh milijonov miši vsako leto identificira okoli 75–80 miši, ki se fenotipsko razlikujejo od sovrstnic (spremenjen zunanji videz, rast, razvojne anomalije, spremenjeno obnašanje ipd.). Miši, na katerih odkrijejo potencialno mutacijo, nato ustrezno parijo, da ugotovijo, če je mutacija dedna (lahko je tudi somatska) in kakšen je način dedovanja (monogeno, recesivno, dominantno ipd.). Ugotovili so, da je spremenjen fenotip pri takih pregledih kar v 75 % primerov posledica spontanij mutacij v genomu (Silver, 1995). Če torej nastane mutacija na področju genoma, ki ima za posledico na zunaj opazno spremembo fenotipa, se lahko žival takoj izloči iz reje ali poskusa. V primeru, da mutacija navzven ni očitno opazna, lahko ostane prikrita dalj časa (Festing, 2003). Slednje se je zgodilo pri C57BL/6JOlaHsd podliniji (C57BL/6J linija, ki jo vzrejajo v Harlanu v Veliki Britaniji), pri kateri so mutacijo, delečijo α -synuclein lokusa, odkrili šele raziskovalci povsem nepričakovano, ko se je ta že prenesla na večino svojih potomcev (Specht in Schoepfer, 2001).

Genetska kontaminacija

Genetska kontaminacija predstavlja najpomembnejši in najpogostejši vzrok genetskih razhajanj in se ji je, za razliko od prvih dveh, moč izogniti. Do genetske kontaminacije lahko pride zaradi nenačrtnih parjenj živali različnih linij med seboj, nepoznavanja značilnosti izogenih linij in genetske nomenklature. Nenamerna parjenja so najpogostejše posledica človeške napake pri označevanju oziroma identifikaciji kletk ali živali (npr. napake pri aplikaciji ali odčitavanju ušesnih števil-k-zarez, kovinskih značk ali tetoviranja, napačno vstavljeni podkožni identifikacijski mikročipi). Kadar gre za živali s podobnimi oznakami kot so C57BL/6 in C57BL/10 ali DBA/1 in DBA/2 ali CBA/J in CBA/Ca itd., ki so si tudi fenotipsko zelo podobne, je nevarnost napake zelo velika. Napake pri označevanju se lahko odkrijejo le, če imajo živali v kletkah drugačno barvo dlake kot bi jo morale imeti glede na označbo kletk. Če pa so si živali fenotipsko podobne, ostane napaka prikrita (Sharp in sod., 2002). Tovrstne človeške napake naredijo pri izogenih linijah veliko več škode kot jo naredijo neizogibne spremembe, ki so posledica rezidualne heterozigotnosti ali mutacije. Zato je povsem razumljivo, zakaj je poznavanje pravil poimenovanja linij tako zelo pomembno, še posebno danes, v času naraščajočega števila genetskih raziskav. Uporaba standardiziranih pravil poimenovanja linij in podlinij je namreč nujna, saj je na ta način omogočena razpoznavnost med njimi že iz same oznake. Zgovoren primer, ki to potrjuje, je odkritje genetske kontaminacije pri 129/SvJ podliniji (Threadgill in sod., 1997), kateri je z namenom boljšega razločevanja podlinij in njihove raznolikosti sledila sprememba nomenklature za vse 129 podlinije (Festing in sod., 1999b).

GENETSKI NADZOR

Kadar vzrejamo ali parimo več različnih linij v istem laboratoriju ali celo v istem prostoru (še posebej, če imamo v reji živali z enako barvo dlake), je nevarnost genetske kontaminacije velika. Pri preprečevanju genetske kontaminacije si lahko pomagamo z natančnim vodenjem rodovniških evidenc, uporabo barvnih kartončkov z natisnjenimi oznakami linije oziroma podlinije, takojšnjim izločanjem pobeglih živali. Genetsko kontaminacijo lahko bistveno zmanjšamo tudi z izbiro sistema vzreje. V ta namen je zelo učinkovit tako imenovani piramidalni sistem vzreje. V tem sistemu imamo tri fizično ločene vzreje za določeno inbridirano linijo s čimer lahko zagotovimo veliko število genetsko uniformnih živali z najmanjšim možnim številom generacij (za podrobnejšo razlago glej Hardy, 2004).

Tudi izobraževanje osebja, ki oskrbuje laboratorijske živali, v smislu poznavanja osnovnih fizioloških značilnosti linij s katerimi dela, lahko prispeva k zmanjševanju človeških napak (Sharp in sod., 2002). Toda v primeru, da pride do nenamernega križanja dveh linij z enakim fenotipom, kontaminacija ostane prikrita (Van Zutphen in sod., 2005). Tudi večletne izkušnje rejcev laboratorijskih glodalcev kažejo, da zgolj skrbno gospodarjenje in dosledno upoštevanje vzrejnih metod, ne morejo v celoti preprečiti človeških napak. Slednje potrjuje nedavno odkriti primer genetske kontaminacije C57BL/6N podlinije pri komercialnem rejcu (Nitzki, 2007).

Inbridirane linije se med seboj razlikujejo, razlike pa se lahko izražajo kot navzven vidne fenotipske razlike (morfološki označevalci), variante proteinov (biokemični in imunološki označevalci) ali razlike v zaporedju DNA (molekularni označevalci). Vse razlike, ki se jih da na katerikoli način določati (morfološko, biokemično, imunološko, molekularno) so t.i. genetski označevalci, ki so sestavni elementi genetskega kartiranja in se hkrati izkoriščajo tudi za kontrolo genetske uniformnosti oziroma avtentičnosti izogenih linij (Mouse Genome Database, 2006).

V nadaljevanju so opisane metode, ki se uporabljajo pri genetskem nadzoru inbridiranih linij. Najprej so na kratko predstavljene metode, ki temeljijo na fenotipsko izraženih razlikah med

inbridiranimi linijami, nato pa metode, ki temeljijo na odkrivanju razlik med linijami na ravni DNA.

Morfološki označevalci

Vsako odstopanje od morfoloških znakov linije je lahko znak genetske kontaminacije ali mutacije (Sharp in sod., 2002). To lahko zelo usposobljeno in izurjeno osebje ugotovi že pri rokovanju in opazovanju živali (Balk, 1992), kot je to praksa v The Jackson Laboratory. Vidna odstopanja znotraj inbridiranih linij so (Mouse Genome Database, 2006):

- sprememba barve dlake živali, njene velikosti, oblike ali teže;
- spremembe obnašanja živali znotraj linije;
- spremembe v fizioloških parametrih;
- spremembe reproduktivnih lastnosti značilnih za linijo – reproduktivne lastnosti so sicer pod velikim vplivom okolja (imajo nizko heritabiliteto) zato niso tako zanesljiv parameter za ugotavljanje možnih genetskih sprememb znotraj linij.

Po razmahu genomskih projektov v prejšnjem desetletju so v zadnjem času vse bolj v ospredju tako imenovani fenomski (angl. phenome) projekti. Namen teh projektov je razviti standardizirano metodologijo določanja fenotipskih podatkov (anatomske, fiziološke in vedenjske značilnosti), da bi povečali uporabnost teh podatkov med različnimi vzrejnimi centri oziroma laboratoriji in dosegli spletne vire, ki bi vse te podatke zbrali na enem mestu. Tako so pri miših (The mouse Phenotype Database Integration Consortium, 2007; Svenson in sod., 2007; Bogue in Grubb., 2004) in pri podganah (Mashimo in sod., 2005) fenomski projekti proizvedli ogromno koristnih meritev, ki lahko raziskovalcem omogočijo primerjanje fenotipov med linijami in podlinijami, identificiranje modelov za nove lastnosti ali bolezni in poiskati pravi model za njihovo študijo. Toda pri vsem naštetem se je treba zavedati, da zgolj z opazovanjem morfoloških znakov in merjenjem fenotipskih podatkov genetske kontaminacije v večini primerov ni mogoče odkriti, zato se je za uspešen nadzor potrebno poslužiti drugih razpoložljivih metod (Sharp in sod., 2002).

Imunološki označevalci

Klasična metoda za dokaz genetske uniformnosti je transplantacija kože med živalmi znotraj linije in ugotavljanje sprejetja oziroma zavrnitve presadka. Živali znotraj inbridirane linije so homozigotne in izogene (tudi za pglavitni histokompatibilnostni kompleks) in imajo tkiva antigensko enaka oziroma histokompatibilna (tkivno skladna), zato ne pride do sprožitve imunskega odziva oziroma zavračanja presadka (Vozelj, 2000). Tako lahko s pomočjo te metode ugotavljamo spremembe na histokompatibilnostnem lokusu, ki nastanejo kot posledica genetske kontaminacije, rezidualne heterozigotnosti ali fiksacije nove spontane mutacije (Sharp in sod., 2002).

Čeprav je metoda občutljiva, enostavna in ne zahteva veliko opreme, je njena največja pomanjkljivost dolgotrajnost (Balk, 1992; Sharp in sod., 2002). Presadke je treba opazovati vsaj 100 dni, predno lahko naredimo oceno o histokompatibilnosti (Balk, 1992; Sharp in sod., 2002). Slabost je tudi ta, da lahko pride do zavrnitve tkiva zaradi slabega celjenja (Balk, 1992) ali medsebojnega poškodovanja presadka. Za preprečevanje slednjega, je za izvedbo te metode potrebno živali nekaterih linij (C57BL/10) nastaniti individualno (Sharp in sod., 2002).

Metoda ne omogoča razlikovanja med sorodnimi linijami (Balk, 1992) oziroma F1 hibridi in njihovimi starši. Kadar namreč parimo miši dveh različnih inbridiranih linij, dedujejo vsi potomci F1 en haplotip od vsakega starša. Posledično potomstvo F1 sprejme presadke od obeh staršev, kar oteži odkrivanje kontaminacije (Vozelj, 2000). S to metodo tudi ni mogoče preveriti avtentičnosti (Van Zutphen in sod., 2005) oziroma vira kontaminacije (Balk, 1992). Zato se je

poleg presajanja kože potrebno poslužiti še drugih metod, ki so opisane v nadaljevanju (Balk, 1992).

Imunološke označevalce lahko ugotavljamo s pomočjo mikrocitotoksičnega testa (limfocitni antigeni), hemaglutinacijskega testa (H2 haplotip in drugi eritrocitni antigeni) ter mešane limfocitne reakcije (določevanje poglavitnih in šibkejših histokompatibilnostih antigenskih razlik pri glodalcih) (Balk, 1992; Sharp in sod., 2002).

Biokemični označevalci

Med biokemične označevalce spadajo alelne variante encimov (izoencimi) ali proteinov, ki se med seboj razlikujejo po fizikalnih ali funkcijskih značilnostih, kot je elektroforetska mobilnost ali encimska aktivnost. Pri genetskem nadzoru so uporabni tisti, ki so med linijami polimorfni in diskriminatorni in so razporejeni po vseh kromosomih genoma (Balk, 1992).

Alelne variante encimov ali proteinov so označene z malimi črkami npr. a,b,c, itd. Za homozigotne linije je značilno, da imajo le en tip variante vsakega označevalca, zaradi česar lahko za vsako posamezno linijo določimo za linijo specifičen vzorec alelnih variant (Sharp in sod., 2002). Za ločevanje linij, ki se danes v raziskavah najpogosteje uporabljajo, običajno zadošča poleg barve dlake le 4–5 različnih biokemičnih označevalcev, medtem ko 10 različnih biokemičnih označevalcev že omogoča ustvariti za linijo značilni vzorec označevalcev in tako nudi dovolj informacij za ugotovitev genetske kontaminacije in pogosto tudi njenega izvora (Sharp in sod., 2002). Podrobni protokoli za 17 pogosto uporabljenih mišjih biokemičnih označevalcev so dostopni na spletu (<http://eanimal.snu.ac.kr/collaboration/gmonitoring/gmonitoring.htm>).

Prednosti metode identifikacije izoencimov so hitra in tehnično enostavna izvedba. Mnogi izoencimi so izraženi v številnih tkivih, zato lahko za določitev nekaterih izoencimov zadošča le odvzem krvi. Ker pa vedno ni mogoče izvesti testiranja biokemičnih označevalcev brez evtanazije živali, se testi običajno izvajajo na senilnih razplodnih živalih (angl. retired breeders). Kar sočasno predstavlja časovno oviro pri ugotavljanju genetske kontaminacije. Pomanjkljivost je tudi ta, da testi niso uporabni za razločevanje nekaterih sorodnih podlinij (Sharp in sod., 2002). Zaradi zgoraj naštetih pomanjkljivosti in razvoja učinkovitejših molekularnih označevalcev (spodaj) se biokemični označevalci danes vse redkeje uporabljajo za potrebe rednega genetskega nadzora.

Molekularni označevalci

Razvoj molekularnega kloniranja in pomnoževanja kratkih DNA odsekov z verižno reakcijo polimeraze (PCR) je omogočil razvoj novih pristopov za nadzor uniformnosti in avtentičnosti inbridiranih linij s pomočjo genetskih označevalcev, kot so polimorfizmi dolžin restrikcijskih fragmentov-PCR označevalci, mikrosateliti in polimorfizmi enega baznega para.

Polimorfizmi dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP)

Minisateliti: Z odkritjem restrikcijskih encimov je bilo omogočeno iskanje označevalcev na ravni DNA (Silver, 1995). Restrikcijski encimi prepoznajo zanje značilno zaporedje DNA in ga cepijo, kar povzroči razkosanje DNA na različno dolge fragmente. Pri tej vrsti označevalca uporabljamo restrikcijske encime, ki ne režejo znotraj minisatelitne ponovitve S pomočjo elektroforeze, ki omogoči razslojevanje DNA fragmentov po dolžini, in prenosom fragmentov na membrano (prenos po Southernu) ter hibridizacijo membrane z označeno multilokusno sondo, ki je običajno zaporedje osnovnega motiva minisatelita, dobimo za posamezno inbridirano linijo značilen vzorec dolžin restrikcijskih fragmentov ali DNA prstni odtis. Razlike med prstnimi

odtisi DNA osebkov so znotraj genetsko heterogene populacije velike, medtem ko se raznolikost med sorodnimi linijami zmanjšuje (Silver, 1995). Različno dolgi fragmenti DNA so namreč lahko posledica prisotnosti ali odsotnosti restrikcijskih mest v zaporedju DNA, zamenjave ene baze, ki povzroči nastanek novega ali uničenje obstoječega restrikcijskega mesta ter delecij ali insercij med dvema restrikcijskima mestoma (Balk, 1992). Večinoma pa so polimorfizmi pri teh označevalcih posledica različnega števila ponovitev minisatelitnega zaporedja (Aker in Huang, 1996), kar ima za posledico različne dolžine fragmentov tudi v primeru, ko polimorfizmov na restrikcijskih mestih ni. Pogostnost polimorfizmov minisatelitov, ki so posledica večjega ali manjšega števila ponovitev osnovnega minisatelitnega elementa (10^{-3} na lokus na gameto) je precej višja od pogostnosti klasičnih točkovnih mutacij (10^{-5} – 10^{-6} na lokus na gameto pri človeku; Jeffreys in sod., 1988) oziroma ocenjene povprečne pogostnosti mutacij pri miših (1.8×10^{-10} mutacij na nukleotid na generacijo; Drake in sod., 1998). To pomeni, da lahko s temi označevalci lažje najdemo genetske razlike tudi med sorodnimi linijami in podlinijami. Predvideva se, da je večja pogostnost mutacij pri minisatelitih kot tudi pri mikrosatelitih posledica neenakega prekrivanja (angl. unequal crossingover) nesestrskih kromatid med mejozo, ki botruje nastanku novih alelov, ki se razlikujejo med seboj le po številu ponovitev motiva osnovnega zaporedja.

Ker imajo živali znotraj izogene linije enak genotip (z izjemo razlik med spoloma v spolnih kromosomih), lahko s sočasno detekcijo 10–40 nevezanih in visoko polimorfnihih lokusov dobimo za posamezno linijo značilen vzorec dolžin restrikcijskih fragmentov ali DNA prstni odtis. To je prednost te metode, saj lahko tako z enim testom določimo polimorfizme na multiplih lokusih in razlikujemo linije od podlinij ter tudi podlinije med seboj (Mannen in sod., 1994). V kolikor pride pri testirani živali do spremenjenega za linijo značilnega DNA prstnega odtisa, žival ne pripada testirani liniji. S primerjanjem različnih vzorcev lahko ugotovimo njen izvor (Balk, 1992). Za izvedbo testa živali ni potrebno evtanazirati, saj običajno za pripravo DNA zadošča košček repa, ušesa ali prsta (Charles River Laboratories, 2002). Slaba stran te metode za rutinski genetski nadzor je dejstvo, da je postopek časovno zahteven, da potrebujemo relativno visoko kvalitetno DNA, da navadno uporabljamo radioizotope za označevanje DNA sond. Prav slednje lastnosti so razlog, da danes RFLP-minisatelitno metodo za rutinski nadzor inbridiranih linij izpodrivajo novejša in učinkovitejša metode kot so mikrosateliti in SNP označevalci.

Enolokusni RFLP z metodo po Southernu: Ta označevalec prav tako temelji na razlikah v dolžini restrikcijskih fragmentov, ki nastanejo zaradi polimorfizmov na mestih restrikcijskih encimov. Genomska DNA osebkov inbridiranih linij se razreže z izbranimi restrikcijskimi encimi, razsloji na agarozni elektroforezi, prenese na membrano s prenosom po Southernu, hibridizira z označeno DNA sondo za določen lokus ter v primeru označevanja DNA sond z radioizotopi, podvrže vizualizaciji rezultatov z autoradiografijo. Ta metoda je bila zelo razširjena za genetsko kartiranje laboratorijskih živali (predvsem miši in podgan) ter izvajanje genetskega nadzora v 80 in 90-tih letih prejšnjega stoletja. Danes se jo zaradi relativne neučinkovitosti (naenkrat pregledujemo le en lokus) in dragega postopka redkeje uporablja za rutinski genetski nadzor, je pa še vedno v rabi pri genetskem nadzoru specifičnih lokusov ali induciranih mutacij (transgenski modeli ipd.). Glede učinkovitosti določanja genetskih razlik med linijami in podlinijami sodi ta metoda med povprečne, kar sta nazorno pokazala Knight in Dyson (1990), ki sta med linijami NOD in C57BL/10 testirala 22 različnih restrikcijskih encimov in našla 30 % polimorfnihih lokusov. Nekoliko večji je odstotek polimorfizmov teh označevalcev med linijami ki izvirajo iz *M. musculus* in *M. spretus* oziroma *M.m.castaneus* – tako je Avner in sod. (1988) ugotovil, da lahko, če primerjamo inbridirane linije, ki izvirajo iz *M. musculus* ali iz *M. spretus*, s tipično DNA sondo, pričakujemo polimorfen RFLP lokus z več kot 90 % verjetnosti.

RFLP-PCR: Osnova te metode je enaka kot je opisano zgoraj, le da postopek bistveno poenostavi vključitev metode PCR. Z metodo PCR pomnožimo del odseka genoma, kjer testiramo prisotnost RFLP označevalca in PCR produkt obdelamo z restrikcijskimi encimi. Sledi razslojevanje produktov na agaroznem ali poliakrilamidnem gelu in barvanje DNA z etidijevim bromidom. Ta metoda je bistveno hitrejša in cenejša od RFLP metode po Southernu, ker temelji na učinkoviti reakciji PCR. Poleg tega ni potrebno imeti na razpolago velikih količin visoko kvalitetne DNA kot je to potrebno za RFLP metodo po Southernu. Za genetski nadzor celega genoma v primerjavi s spodaj naštetimi metodami tudi RFLP-PCR metoda še vedno ni dovolj učinkovita. Zato se danes v glavnem uporablja za genetski nadzor specifičnih lokusov oziroma mutacij (Horvat in Bunger, 1999) ter prisotnosti oziroma odsotnosti transgenskih vključkov (Liu in sod., 2006).

Mikrosatelitni polimorfizmi (angl. Simple Sequence Length Polymorphism; SSLP)

Mikrosateliti so kratka ponavljajoča se zaporedja DNA, ki se dedujejo kodominantno in so visoko polimorfni glede na število ponovitev osnovnega motiva mikrosatelita. Podobno kot pri zgoraj opisanih minisatelitih, je višja pogostnost mutacij na teh lokusih rezultat neenakega prekrivanja kromatid v mejozi, lahko pa so tudi posledica zdrsa polimeraze med podvojevanjem DNA, ko polimeraza »preskoči« določeno ponovitev mikrosatelita in tako nastane alel s krajšo dolžino. Genomske lokacije nukleotidnih zaporedij mikrosatelitov so znotraj vrst ohranjene, medtem ko je število ponovitev teh zaporedij različno in značilno za posamezno linijo oziroma podlinijo (primer za miši v preglednici 1). Vsak mikrosatelit je običajno obdan z edinstvenimi, neponavljajočimi se zaporedji v genomu (enolokusna sekvenca). Na teh področjih določimo PCR začetne oligonukleotide, ki so običajno 20bp dolga zaporedja komplementarna edinstveni DNA na bočnih področjih mikrosatelita.

Določanje dolžine mikrosatelitnih zaporedij je učinkovito orodje genetskega nadzora inbridiranih linij, saj so ti označevalci visoko polimorfni tudi med sorodnimi podlinijami. Ključni dejavnik pri rutinskem testiranju inbridiranih linij je izbor ustreznih mikrosatelitnih označevalcev. Pomembno je, da pri genetskem nadzorovanju izberemo tiste mikrosatelitne označevalce (pregl. 1), ki so med linijami oziroma podlinijami v reji diskriminatorni (Festing, 2003).

Preglednica 1. Dolžina mikrosatelitov na posameznih lokusih med različnimi mišjimi linijami. Odebeljene številke označujejo alelne razlike. Simbol označevalca **DNMitN** pomeni: D – nepoimenovan DNA označevalec; N – številka kromosoma; Mit – laboratorijska koda; N – številka lokusa. Tako D1Mit308 označuje 308 MIT mikrosatelitni označevalec, ki se nahaja na kromosomu 1 (povzeto po www.harlan.com).

Table 1. The length of microsatellite loci between different mouse strains. The bolded numbers indicate alelic differences. These markers are denoted by symbols **DNMitN**, where the D indicates an anonymous DNA marker; N – the number of the chromosome; Mit – the Laboratory Registration Code; N – the number of the locus. For example, D1Mit308 is the 308 MIT microsatellite marker assigned to chromosome 1.

Mišja linija	D1Mit 308	D5Mit 79	D6Mit 102	D9Mit 18	D11Mit 236
C57BL/6NHsd	150 bp	106 bp	146 bp	180 bp	106 bp
CBA/JCrHsd	160 bp	106 bp	126 bp	210 bp	106 bp
A/JOlaHsd	160 bp	106 bp	140 bp	210 bp	106 bp
BALB/cAnNHsd	160 bp	136 bp	140 bp	213 bp	118 bp

Tehnika vključuje odvzem vzorca tkiva (košček repa, ušesa), pripravo DNA in pomnoževanje enega ali več mikrosatelitov z uporabo enolokusnih PCR začetnih oligonukleotidov. Ločevanje velikosti mikrosatelitov omogoča elektroforeza na agaroznem gelu ali poliakriamidnem gelu skupaj z vzorci živali z znanim genotipom. Različno dolgi aleli prepotujejo različne dolžine. Če proge niso v enaki vrsti pomeni, da genotipa nista identična (Sharp in sod., 2002).

Pri miših je prva objava izolacije in kartiranja seta mikrosatelitov (Dietrich in sod., 1992) pomenila prelomnico v genomskih raziskavah in nudila možnost prehoda rutinskega genetskega nadzora od relativno neučinkovitih RFLP tehnik na nadzorovanje z mikrosateliti. Izolirali so set 317 mikrosatelitnih lokusov med seboj oddaljenih v poprečju 4,3 cM in ugotovili, da je pričakovana stopnja polimorfnosti med najpogostejše uporabljenimi linijami miši 50 %. Čeprav baze podatkov na spletu (npr. MGI: http://www.informatics.jax.org/menus/strain_menu.shtml) danes vsebujejo precej večje število mikrosatelitnih lokusov in omogočajo iskanje polimorfnih označevalcev med željenimi linijami in podlinijami miši, je za potrebe genetskega nadzora koristneje uporabiti preverjene sete mikrosatelitov iz originalne literature. Mikrosatelitni označevalci so namreč lahko s praktičnega vidika določanja v laboratoriju bolj ali manj robustni in učinkoviti, zato nam lahko preverjeni rezultati v originalni literaturi pri izbiri seta mikrosatelitov za naše potrebe prihranijo veliko časa. V objavi Dietricha in sod. (1992) je bila detekcija mikrosatelitov z radioaktivnimi označenimi oligonukleotidnimi začetniki še vedno sorazmerno neučinkovita in tehnično zahtevna. Zato so raziskovalci začeli iskati učinkovitejše in uporabniku bolj prijazne pristope, kot je uporaba fluorescence v danes že standardnih laserskih DNA analizatorjih za detekcijo mikrosatelitov (Rhodes in sod., 1997). Nadgradnja tega sistema je delo Witmerja in sod. (2003), ki so razvili set 314-ih visoko polimorfnih mikrosatelitnih označevalcev in jih optimizirali s tako imenovano multipleks PCR, ki omogoča hkratno določanje večjega števila mikrosatelitov v isti reakciji z uporabo štirih različnih fluorescenčnih barvil. V zadnjem času se pojavljajo tudi protokoli optimizirani za določen tip celic kot je na primer sperma (Kato in sod., 2005), kar je zelo uporabno pri genetskem nadzoru kriopreserviranih spolnih celic.

Tudi pri podganah so se mikrosateliti izkazali za zelo učinkovite molekularne označevalce pri rutinskem genetskem nadzoru. Prva objava s 134 podganjimi mikrosateliti (Serikawa in sod., 1992) je sprožila pravo revolucijo pri kartiranju podganjega genoma in omogočila učinkovit genetski nadzor standardnih linij podgan po celotnem genomu. Nedavno je bil objavljen članek (Mashimo in sod., 2006), kjer so razvili visoko polimorfen set mikrosatelitov primeren tudi za uporabo v rutinskem genetskem nadzoru podganjih linij.

Polimorfizmi enega baznega para (angl. Single Nucleotide Polymorphism; SNP)

Polimorfizmi enega baznega para ali SNP predstavljajo vrsto polimorfizmov, ki so najbolj gosto in enakomerno razporejeni po genomu in omogočajo odkrivanje genetske osnove za lastnosti, ki so se fiksirale v določeni liniji kot posledica selekcijskega parjenja ali mutacije (Petkov in sod., 2004).

Med inbridiranimi linijami miši je bilo že v eni od prvih objav (Wiltshire in sod., 2003) opisanih preko 70.000 SNP. V povprečju so takrat izračunali 14 SNP na 10 kb, vendar pa je porazdelitev SNP polimorfizmov v genomu neenakomerna. Obstajajo odseki z visoko stopnjo (40 SNP na 10 kb) in odseki z nizko stopnjo SNP polimorfizma (0,5 SNP na 10kb). Pri primerjanju genomov različnih inbridiranih linij (129, C3H, BALB z B6) se je izkazalo, da predstavljajo odseki z nizko stopnjo SNP kar 2/3 genoma. Enako distribucijo kaže tudi stopnja SSLP polimorfizma, vendar pa so SSLP polimorfni tudi na področjih z nizko stopnjo SNP polimorfizma, kar se sklada z njihovo visoko mutacijsko naravo (Wade in sod., 2002). SNP, ki se dedujejo vezano, predstavljajo haplotip. Kar 30–60 % vseh haplotipov v genomu imajo linije

med seboj enake. Ti predstavljajo regije genoma iz katerih lahko sklepamo na skupno poreklo posameznih linij (Wiltshire in sod., 2003).

V The Jackson Laboratory so vpeljali sistem nadzora genetskega ozadja inbridiranih linij miši, ki temelji na analizi visoko polimorfni SNP. Metoda naj bi bila zanesljiva, enostavna, obsežna in ekonomična tudi za manjše ustanove (Petkov in sod., 2004a, 2004b). Na osnovi predhodno opravljenih testov pri 48-ih linijah, so določili distribucijo 235 srednje do visoko polimorfni označevalcev (kjer se redkejši alel pojavlja med linijami s frekvenco 0,1 ali več), ki so bili vsaj 2 cM narazen (od 3.8 do 13.5 cM). Na ta način so hoteli izbrati le tiste SNP, ki ne pripadajo istemu haplotipu. Prednost pri izboru so imeli tisti SNP, ki so bili opaženi pri več kot petih linijah in katerih najmanj pogosti tip alelov je bil določen pri vsaj dveh linijah. Ti kriteriji pa so bili bolj ohlapni za področja z nizko stopnjo SNP polimorfizma (Petkov in sod., 2004).

Za določitev minimalnega števila označevalcev so se poslužili statističnih analiz. Da bi lahko z 99 % gotovostjo dobili vsaj tri razlike med dvema linijama, so morali testirati živali z vsaj 26 označevalci. Za kontrolo genetskega ozadja so izbrali set 28 visoko informativnih SNP, razporejenih po vseh kromosomih. Nekaj izmed njih tudi specifičnih za ločevanje med sorodnimi linijami. Z izborom so dosegli vzorec, kjer se 98 % testiranih linij med seboj razlikuje v treh ali več označevalcih (Petkov in sod., 2004).

V posodobljenih bazah podatkov danes zasledimo že več kot milijon SNP označevalcev (glej SNP baze podatkov pri miših), kjer je najkoristnejša baza na spletni strani The Jackson Laboratory (<http://www.jax.org/phenome/snp.html>), ki združuje SNP označevalce iz različnih virov in ponuja orodja za navzkrižno primerjanje. Čeprav je večina teh primerjav ponujena za 16 danes najpogosteje uporabljenih linij miši, ima baza dostop do SNP podatkov za več kot 125 različnih linij. Pri podganah je število SNPjev in genotipiziranih linij podgan precej manjše kot pri miših, vendar se tudi pri podganah pojavljajo objave (Zimdahl s sod., 2004, Smits in sod., 2005) ter baze podatkov za SNP genotipe (SNP baze podatkov pri podganah), ki bodo podobno kot pri miših kmalu postale najbolj koristne za izbiro in uporabo označevalcev za genetski nadzor tudi pri tej vrsti laboratorijskih živali.

PREPREČEVANJE GENETSKIH RAZHAJANJ ZNOTRAJ LINIJ

Če torej želimo preveriti uniformnost in avtentičnost živali posamezne linije, se lahko poslužimo zgoraj opisanih metod. Toda sočasno se moramo zavedati, da so metode genetskega nadzora usmerjene predvsem v preprečevanje genetskih kontaminacij linij oziroma podlinij in ne odkrivanju mutacij ali razlik zaradi rezidualne heterogenosti. Če se hočemo izogniti vsem dejavnikom genetskega razhajanja znotraj linij, se moramo poslužiti metode shranjevanja embrijev (Van Zutphen in sod., 2005).

Danes je mogoče sesalske embrije shranjevati z uporabo posebnih tehnik, ki vključujejo zamrzovanje in shranjevanje preimplantacijskih embrijev v tekočem dušiku. Ta proces shranjevanja embrijev na zelo nizki temperaturi imenujemo kriopreservacija. Tehnika je vsestransko uporabna. Poslužujejo se jo v smislu preprečevanja izumrtja dragocenih inbridiranih linij, do katerega bi lahko prišlo zaradi fatalne bolezni (vnos patogenov) ali nesreče (požar) v reji. Omogoča zagotavljati nenehno dostopnost sicer redko uporabljenih linij brez potrebe po vzdrževanju živali v vzrejnih centrih. Kar se je pokazalo zelo dobrodošlo tudi pri genetsko spremenjenih živalih, katerih število linij močno narašča. Prav tako se jo lahko poslužimo za začetek vzreje gnotobiotičnih živali ali živali prostih specifičnih patogenov. In nenazadnje, služi tudi kot sredstvo preprečevanja genetskega razhajanja znotraj linij, saj s kriopreservacijo embrijev vplivamo na zmanjšanje števila generacij in s tem posledično zmanjšujemo verjetnost pojava dejavnikov, ki so vzrok genetskemu razhajanju znotraj linij (Van Zutphen in sod., 2005).

GENETSKI NADZOR V PRAKSI

Ker so inbridirane linije homozigotne za celoten genom je relativno enostavno poiskati lokuse, ki se razlikujejo med različnimi inbridiranimi linijami. Za ugotavljanje avtentičnosti inbridiranih linij (pregl. 2) je ponavadi dovolj, da določimo 5–6 polimorfni genetskih označevalcev, ki so nevezani (ležijo na različnih kromosomih). Na ta način lahko z veliko verjetnostjo odkrijemo možno genetsko kontaminacijo.

Preglednica 2. Princip izbire števila genetskih označevalcev za izvajanje genetskega nadzora: primer spodaj prikazuje, da s 6 polimorfnimi nevezanimi genetskimi označevalci lahko z 98,5 % verjetnostjo ugotovimo, če sta pregledani inbridirani liniji genetsko kontaminirani

Table 2 Principle for selecting the number of markers for genetic monitoring: example below demonstrate that with 6 polymorphic non-linked markers one can detect genetic contamination in two inbred lines with 98.5% probability

Genetski označevalec ¹	Alel Inbridirane Linije št. 1	Alel Inbridirane Linije št. 2	Kumulativna verjetnost, da lahko odkrijemo genetsko kontaminacijo	
A	A1	A2	$(1-(0,5)^1)$	50 %
B	B2	B1	$(1-(0,5)^2)$	75 %
C	C1	C2	$(1-(0,5)^3)$	87 %
D	D1	D2	$(1-(0,5)^4)$	93 %
E	E2	E1	$(1-(0,5)^5)$	97 %
F	F2	F1	$(1-(0,5)^6)$	98,5 %

¹ genetski označevalci so ne-vezani (ležijo na različnih kromosomih)

Izbrane sete šestih (ali več) genetskih označevalcev (pregl. 2) je potrebno menjati vsako generacijo. Priporoča se, da na vsake 3–4 generacije pregledamo vsaj 2 genetska označevalca na vsak kromosom. S tovrstnim genetskim nadzorom, beleženjem fenotipskih podatkov (telesne mase, reprodukcija, barva dlake) imamo veliko možnost določanja kontaminacij in izbire takih staršev, ki po genotipu in fenotipu ustrezajo značilnostim določene inbridirane linije oziroma podlinije laboratorijskih živali.

Od vseh v tem prispevku naštetih metod genetskega nadzora, so danes uporabljene v glavnem metode določanja SNP genotipov, mikrosatelitov ter PCR-RFLP. Prvi dve sta v rabi predvsem za pregled genetske variabilnosti po celotnem genomu, tretja metoda je uporabna, ko opravljamo genetsko kontrolo samo za majhno število lokusov, specifičnih mutacij ali transgenih vključkov. V Sloveniji imamo v glavnem manjše vzrejne in poskusne centre. Čeprav pravila nomenklature navajajo, da ločena vzreja določene linije lahko vodi v razvoj podlinije po 20 generacijah, pa večji vzrejni centri kot so The Jackson Laboratory in Charles Rivers Laboratories opozarjajo, da lahko pride do razvoja podlinij že po 10 generacijah inbridinga ali že samo po treh generacijah naključnih parjenj. V primeru, da vzrejni centri in poskusne enote nimajo vpeljanega rednega genetskega nadzora, ter ustreznih sistemov piramidalne vzreje priporočamo, da za poskusne namene kupujejo inbridirane linije od komercialnih vzrejnih centrov z ustreznimi mikrobiološkimi in genetskimi certifikati. V raziskovalnih člankih lahko namreč uporabimo ime neke linije (npr. C57BL/6J, ki jo sicer dobimo le v The Jackson Laboratory) samo v primeru, če uporabimo živali, ki so bile vzrejene v naših vzrejnih enotah do 10 generacij inbridinga ali do treh generacij naključnih parjenj. V nasprotnem primeru je potrebno laboratorij registrirati, s čimer k oznaki linije dodeli tudi dodatna koda. Pogosto se inbridirane linije uporabljajo tudi za

povratna križanja za ohranjanje transgenih modelov v določenem genetskem ozadju. Tudi v tem primeru veljajo zgornja pravila in potreba po genetskem nadzoru in ustreznem sistemu vzreje.

Raziskovalci v poskusih pogosto uporabljajo linije, ki so jih razvili sami bodisi z umetno selekcijo ali fiksacijo spontanah oziroma induciranih mutacij. Tudi pri teh linijah veljajo enaka pravila glede nastanka podlinij in pomena genetskega nadzora. Še več, ker so bile te linije razvite znotraj poskusne enote in z njimi razpolaga le njihov laboratorij, se v primeru genetske kontaminacije ali nesreče tak vir ne more nadomestiti s ponovnim nakupom iz drugih vzrejnih centrov. Za te primere priporočamo, poleg striktnega izvajanja vzreje po piramidalnem sistemu, ločeni vzreji in rednem genetskem nadzoru temeljnih kolonij tudi program kriopreservacije in hranjenja zamrznjenih zarodkov na vsaj dveh lokacijah.

Metodološko in cenovno je za manjše vzrejne centre, kot jih imamo v Sloveniji najprimernejša metoda za rutinski genetski nadzor še vedno uporaba mikrosatelitnih označevalcev določenih na gelski elektroforezi. V ta namen lahko uporabimo agarozne gele (navadno 3–4 %), v zadnjem času pa so zelo učinkoviti tudi sistemi, kjer kupimo že vnaprej narejene gele, ki imajo precej krajši čas detekcije (e-geli – Invitrogen). Če je volumen dela večji se lahko uporabijo mikrosateliti v multipleks PCR reakcijah (več mikrosatelitov naenkrat) na fluorescenčnih DNA analizatorjih (npr. Applied Biosystems). Z ustanovitvijo centra za biočipe v Sloveniji (center za funkcijsko genomiko in biočipe na Medicinski fakulteti; <http://cfgbc.mf.uni-lj.si/>) smo tudi v Sloveniji pridobili tehnološko infrastrukturo, ki bo omogočala razvoj in uporabo SNPjev za genetski nadzor laboratorijskih živali, sploh za tiste raziskovalce in centre, ki izvajajo množično genotipiziranje. Če je namen le občasni genetski nadzor manjšega števila živali in center oziroma laboratorij nima ekspertize na področju genetskega nadzora je učinkoviteje, da se v tem primeru poslužujemo sodelovanja z domačimi ali tujimi laboratoriji, ki imajo že vpeljan sistem rutinskega genetskega nadzora ali komercialnih servisov specializiranih za rutinski genetski nadzor (Komerčni servisi za genetski monitoring).

ZAKLJUČKI

Danes imamo torej na voljo veliko število različnih metod genetskega nadzora, s pomočjo katerih lahko zagotovimo uniformnost in avtentičnost inbridiranih linij. Običajno je izbor metod odvisen od števila in sorodnosti linij oziroma podlinij, ki jih imamo v laboratoriju. Toda poleg zanesljivosti metode so pri rutinskem nadzoru pomembni tudi drugi dejavniki kot so enostavnost, hitrost, zmogljivost (sočasno testiranje večjega števila vzorcev) in ekonomičnost. Na podlagi pregledane literature na tem področju ugotavljamo, da v večjih vzrejnih centrih za genetski nadzor uporabljajo večinoma SNP označevalce, v manjših centrih in individualnih laboratorijih pa večinoma mikrosatelitne označevalce. Druge vrste označevalcev, ki smo jih opisali v prispevku se uporablja vse redkeje in v glavnem kot dopolnilo SNP ali mikrosatelitnim označevalcem.

ZAHVALA

Za so-financiranje se zahvaljujemo Agenciji za raziskovalno dejavnost (ARRS) in Ministrstvu za zdravje za projekt CRP V3-0365.

SUMMARY

Today, there are many different genetic monitoring methods to assure uniformity and purity of inbred strains. Each of these methods has its advantages, but usually selection of the methods depends on the number and the level of genetic relatedness between the strains or substrains in

the facility. However, besides reliability of the method, there are also other factors important for implementation of the method in the facility such as the total assay time per animal or locus, technical simplicity of the method, ability to scale up the method for a high through-put analyses and cost efficiency. On the basis of reviewed literature on the topic of genetic monitoring we conclude that today, large breeding centres tend to use primarily SNP markers whereas smaller breeding facilities or individual animal labs still prefer microsatellites. Other types of markers described herein are being used less frequently and usually only complementary to the SNP or microsatellite-based genetic monitoring.

VIRI

- Aker, M./ Huang, H.V. Extreme heterogeneity of minor satellite repeat arrays in inbred strains of mice. *Mamm. Genome*, 7(1996), 62–64.
- Avner, P./ Amar, L./ Dandolo, L./ Guenet, J.L. Genetic analysis of the mouse using interspecific crosses. *Trends Genet.*, 4(1988), 18–23.
- Balk, M.W. Rodent genetics and genetic quality control for inbred and F1 hybrid strains. *Buletin*, 1992.
- Beck, J.A./Lloyd, S./ Hafezparast, M./ Lennon-Pierce, M./ Eppig, J.T./ Festing, M.F./ Fisher, E.M. Genealogies of mouse inbred strains. *Nat. Genet.*, 24(2000), 23–25.
- Bogue M.A./ Grubb, S.C. The Mouse Phenome Project. *Genetica*, 122(2004), 71–74.
- Charles River Laboratories. Background strain characterization: Who is that mouse?. *The Sentinel*, Summer, 2002.
- Dietrich, W./ Katz, H./ Lincoln, S.E./ Shin, H.S./ Friedman, J./ Dracopoli, N.C./ Lander, E.S. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*, 131(1992), 423–447.
- Festing, M.F. Laboratory animal genetics and genetic quality control. V: *Handbook of laboratory animal science: essential principles and practices* (ur.: Hau, J./ van Hoosier, G.L.). Boca Raton, CRC Press LLC, 2003, 173–203.
- Festing, M.F. Warning: the use of heterogeneous mice may seriously damage your research. *Neurobiol. Aging*, 20(1999), 237–244.
- Festing, M.F./ Simpson, E.M./ Davisson, M.T./ Mobraaten, L.E. Revised nomenclature for strain 129 mice. *Mamm. Genome*, 10(1999a), 836.
- Flanagan, S.P. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet. Res.*, 8(1966), 295–309.
- Hardy, P. Gnotobiology and breeding techniques. V: *The laboratory mouse* (ur.: Hedrich, H.J.) London, Academic Press, 2004, 409–433.
- Horvat, S./ Bunker, L. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for the mouse leptin receptor (*Lepr*(db)) mutation. *Lab. Anim.*, 33(1999), 380–384.
- International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice and Rat Genome and Nomenclature Committee. Rules for nomenclature of mouse and rat strains (on line). Mouse Genome Database, Mouse Genome Informatics Web Site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine. World Wide Web, 2005.
- Kaloh, H./ Yoshino, S./ Inui, Y./ Honda, S./ Takabayashi, S. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse. *Exp. Anim.*, 54(2005), 373–376.
- Knight, A.M./ Dyson, P.J. Detection of DNA polymorphisms between two inbred mouse strains-limitations of restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Mol Cell Probes.*, 4(1990), 497–504.
- Komercialni servisi za genetski monitoring:
<http://www.elchrom.com/public/index.php?page=52>; <http://www.cidr.jhmi.edu/index.html>;
<http://www.taconic.com/wmspage.cfm?parm1=1426>;
http://www.criver.com/research_models_and_services/genetic_testing_services/index_gts.html;
<http://www.illumina.com/pages.ilmn?ID=163>;
http://www.identigene.com/SWIMX/Products/mouse_genotyping.asp ALI
http://www.biopioneerinc.com/bpr/index.php?target=categories&category_id=239
- Kurtz, T.W./ Montano, M./ Chan, L./ Kabra, P. Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, 13(1989), 188–192.
- Liu, K./ Hipkens, S./ Yang, T./ Abraham, R./ Zhang, W./ Chopra, N./ Knollmann, B./ Magnuson, M.A./ Roden, D.M. Recombinase-mediated cassette exchange to rapidly and efficiently generate mice with human cardiac sodium channels. *Genesis*, 44(2006), 556–564.
- Ločniškar, F. Katalog znanj: splošna živinoreja, biološke osnove, genetika z enciklopedičnim opisom pojmov in gesli v slovenščini, angleščini in nemščini, Domžale, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, 1999.
- Lovell, D.P./ Totman, P./ Bigelow, S.W./ Nebert, D.W./ Hoffman, H.A./ Greig, J.B./ Festing, M.F. An investigation of genetic variation within a series of congenic strains of mice. *Lab. Anim.*, 18(1984), 291–297.

- Mannen, H./ Tsuji, S./ Fukuta, K./ Goto, N. Identification of sublines of inbred strains of mice and assessment of genetic relationships between substrains or sublines by DNA fingerprinting. *Jikken Dobutsu*, 43(1994), 521–526.
- Mashimo, T./ Voigt, B./ Kuramoto, T./ Serikawa, T. Rat Phenome Project: the untapped potential of existing rat strains. *J. Appl. Physiol.*, 98(2005), 371–379.
- Mashimo, T./ Voigt, B./ Tsurumi, T./ Naoi, K./ Nakanishi, S./ Yamasaki, K./ Kuramoto, T./ Serikawa, T. A set of highly informative rat simple sequence length polymorphism (SSLP) markers and genetically defined rat strains. *BMC Genet.*, 4(2006), 19–27.
- Mouse Genome Database, Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, 2006.
- Nitzki, F./ Kruger, A./ Reifenberg, K./ Wojnowski, L./ Hahn, H. Identification of a genetic contamination in a commercial mouse strain using two panels of polymorphic markers. *Lab. Anim.*, 41(2007), 218–28.
- Pennisi, E. A mouse chronology. *Science*, 288(2000), 248–257.
- Perše, M./ Rozman, D. Značilnosti in pravila poimenovanja inbridiranih linij miši. *Vet. Nov.*, 32(2006), 23–29.
- Petkov, P.M./ Cassell, M.A./ Sargent, E.E./ Donnelly, C.J./ Robinson, P./ Crew, V./ Asquith, S./ Haar, R.V./ Wiles, M.V. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse. *Genomics*, 83(2004a), 902–911.
- Petkov, P.M./ Ding, Y./ Cassell, M.A./ Zhang, W./ Wagner, G./ Sargent, E.E./ Asquith, S./ Crew, V./ Johnson, K. A./ Robinson, P./ Scott, V.E./ Wiles, M.V. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships. *Genome Res.*, 14(2004b), 1806–1811.
- Rhodes, M./ Dearlove, A./ Straw, R./ Fernando, S./ Evans, A./ Greener, M./ Lacey, T./ Kelly, M./ Gibson, K./ Brown, S.D./ Mundy, C. High-throughput microsatellite analysis using fluorescent dUTPs for high-resolution genetic mapping of the mouse genome. *Genome Res.*, 7(1997), 81–86.
- Serikawa, T./ Kuramoto, T./ Hilbert, P./ Mori, M./ Yamada, J./ Dubay, C.J./ Lindpainter, K./ Ganten, D./ Guenet J.L./ Lathrop, G.M./ Beckmann, J.S. Rat gene mapping using PCR-analyzed microsatellites. *Genetics*, 131(1992), 701–721.
- Sharp, J.J./ Sargent, E.E./ Schweitzer, P.A. Genetic monitoring. V: Laboratory animal medicine (ur.: Fox, J.G./ Andersen, L.C./ Loew, F.M./ Quimby, F.W.). San Diego, California, Academic Press, 2002, 1117–1128.
- Silver, L.M. Mouse genetics: Concepts and applications. Oxford, University Press, 1995.
- Smits B.M.G./ Guryev, V./ Zeegers, D./ Wedekind, D./ Hedrich, H.J./ Cuppen, E. Efficient single nucleotide polymorphism discovery in laboratory rat strains using wild rat-derived SNP candidates. *BMC Genomics*, 6(2005), 170–179.
- SNP baze podatkov pri miših:
<http://phenome.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi?rtn=snp/door>; <http://mousesnp.roche.com/>;
<http://www.well.ox.ac.uk/rmott/mouse/inbreds/>; SNP baze podatkov pri podganah; <http://cascad.niob.knaw.nl/>;
http://www.ensembl.org/Rattus_norvegicus/index.html.
- Specht, C.G./ Schoepfer, R. Deletion of the alpha-synuclein locus in a subpopulation of C57BL/6J inbred mice. *BMC. Neurosci.*, 2(2001), 11.
- Svenson, K.L./ Von Smith, R./ Magnani, P.A./ Suetin, H.R./ Paigen, B./ Naggert, J.K./ Li, R./ Churchill, G.A./ Peters, L.L. Multiple Trait Measurements in 43 Inbred Mouse Strains Captures the Phenotypic Diversity Characteristic of Human Populations. *J. Appl. Physiol.*, 2007, E-pub pred tiskanim člankom.
- The Mouse Phenotype Database Integration Consortium. Integration of mouse phenome data resources. *Mamm. Genome*, 18(2007), 157–163.
- Threadgill, D.W./ Yee, D./ Matin, A./ Nadeau, J.H./ Magnuson, T. Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm. Genome*, 8(1997), 390–393.
- Van Zutphen, L.F.M./ Hedrich, H.J./ van Lith, H.A./ Prins, J.B. Genetic standardization. V: Principles of laboratory animal science (ur.: Van Zutphen, L.F.M./ Baumans, V./ Beynen, A.C.). Amsterdam, Elsevier, 2005, 129–147.
- Vozelj, M. Temelji imunologije. Ljubljana, DZS, 2000.
- Wade, C.M./ Kulbokas, E.J./ III, Kirby, A.W./ Zody, M.C./ Mullikin, J.C./ Lander, E.S./ Lindblad-Toh, K./ Daly, M.J. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature*, 420(2002), 574–578.
- Wiltshire, T./ Pletcher, M.T./ Batalov, S./ Barnes, S.W./ Tarantino, L.M./ Cooke, M.P./ Wu, H./ Smylie, K./ Santrosyan, A./ Copeland, N.G./ Jenkins, N.A./ Kalush, F./ Mural, R.J./ Glynne, R.J./ Kay, S.A./ Adams, M.D./ Fletcher, C.F. Genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis defines haplotype patterns in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(2003), 3380–3385.
- Witmer, P.D./ Doheny, K.F./ Adams, M.K./ Boehm, C.D./ Dizon, J.S./ Goldstein, J.L./ Templeton, T.M./ Wheaton, A.M./ Dong, P.N./ Pugh, E.W./ Nussbaum, R.L./ Hunter, K./ Kelmenson, J.A./ Rowe, L.B./ Brownstein, M.J./ The development of a highly informative mouse Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) marker set and construction of a mouse family tree using parsimony analysis. *Genome Res.*, 13(2003), 485–491.
- Wotjak, C.T. C57BL/6J/BOX? The importance of exact mouse strain nomenclature. *Trends Genet.*, 19(2003), 183–184.

- Zimdahl, H./ Nyakatura, G./ Brandt, P./ Schulz, H./ Hummel, O./ Fartmann, B./ Brett, D./ Droege, M./ Monti, J./ Lee, Y.A./ Sun, Y./ Zhao, S./ Winter, E.E./ Ponting, C.P./ Chen, Y./ Kasprzyk, A./ Birney, E./ Ganten, D./ Hubner, N. A SNP map of the rat genome generated from cDNA sequences. *Science*, 303(2004), 807.
- Zimmermann, F./ Weiss, J./ Reifenberg, K. Breeding and assisted reproduction techniques. V: *The laboratory rat* (ur.: Krinke, G.J.). London, Academic Press, 2000, 177–198.

POTEK FERMENTACIJE ŠKROBA OB DODATKU RAZLIČNIH VRST TANINOV

Urška SIVKA ^{a)} in Andrej LAVRENČIČ ^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, e-pošta: sursek@gmail.com.

^{b)} Isti naslov kot ^{a)}, doc., dr.

Delo je prispelo 12. julija 2007, sprejeto 26. oktobra 2007.

Received July 12, 2007, accepted October 26, 2007.

IZVLEČEK

Proučevali smo vpliv vrste in koncentracije različnih taninskih izvlečkov na kinetiko *in vitro* fermentacije škroba v vampnem soku. K škrobu smo dodali tri taninske izvlečke: kostanjev tanin (F75), kebračo tanin (QUE) in taninsko kislino (TAK) v različnih koncentracijah: 0 (kontrola), 0,33, 0,67 in 1,33 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija. S pomočjo Gompertzove funkcije smo ocenili kazalnike fermentacije, skupno potencialno produkcijo plina (B), specifično hitrost fermentacije (C) in konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A) ter izračunali čas največje hitrosti fermentacije (ČNHF), največjo hitrost fermentacije (NHF) in časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG). Z dodatkom F75 (507,8 ml g⁻¹ SS) in QUE (474,2 ml g⁻¹ SS), se je skupna potencialna produkcija plina iz škroba v primerjavi s kontrolo (528,4 ml g⁻¹ SS) statistično značilno zmanjšala ($p < 0,05$). Nasprotno pa se je skupna potencialna produkcija plina z dodatkom TAK v povprečju povečala. Največjo hitrost fermentacije škroba (50,6 ml h⁻¹) smo izmerili po skoraj 9. urah inkubacije. ČNHF se je z dodatkom taninskih izvlečkov statistično značilno podaljšal, še najbolj ob dodatku 0,33 mg taninskih izvlečkov/ml medija. Vrsta taninskega izvlečka in koncentracija taninskega izvlečka sta statistično značilno vplivala ($p < 0,01$) na največjo hitrost fermentacije škroba. Še najmanj se je NHF zmanjšala ob dodatku F75 (42,0 ml h⁻¹), medtem ko se je NHF ob dodatku TAK zmanjšala na 38,1 ml h⁻¹, ob dodatku QUE pa na 34,7 ml h⁻¹. NHF se je najbolj zmanjšala ob dodatku taninskih izvlečkov v koncentraciji 0,67 mg ml⁻¹ medija.

Ključne besede: prehrana živali / tanini / škrob / fermentacija / vamp / Gompertz / produkcija plina

THE COURSE OF FERMENTATION OF STARCH WITH THE ADDITION OF DIFFERENT TYPES OF TANNINS

ABSTRACT

Four different concentrations (0 (control), 0.33, 0.67 and 1.33 mg ml⁻¹ medium) of three tannin extracts (chestnut (F75) and quebracho (QUE) tannin extracts and tannic acid (TAK) were used to investigate their effect on the kinetics of *in vitro* fermentation of starch. Gas production was measured at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h after the start of incubation. Gompertz model was used to estimate kinetic parameters "B" (total potential gas production), "C" (relative degradation rate) and "A" (constant decay in relative degradation rate). First and second derivatives of Gompertz model were used to calculate the maximum fermentation rate (MFR) and time of maximum fermentation rates (TMFR). Addition of F75 (507.8 ml g⁻¹ DM) and QUE (474.2 ml g⁻¹ DM) significantly decreased ($P < 0.05$) total potential gas production compared to control (528.4 ml g⁻¹ DM). On contrary, the addition of TAK (560.5 ml g⁻¹ DM) significantly increased total potential gas production. Maximum fermentation rate of starch (50.6 ml h⁻¹) occurred after almost 9 hours of incubation. The addition of tannin extracts significantly increased TMFR; this increase was greatest when 0.33 mg of tannin extracts were added to the

medium. Type and concentration of tannin extracts had significant effect ($P < 0.01$) on maximum fermentation rate of starch. The lowest reduction in MFR was determined when F75 was used (MFR reduced to 42.0 ml h^{-1}), while it was reduced to 38.1 ml h^{-1} when TAK and 34.7 ml g^{-1} when QUE were used. The greatest reduction in MFR was determined when the concentration of 0.67 mg of tannin extracts/ml medium was used.

Key words: animal nutrition / tannins / starch / fermentation / rumen / Gompertz / gas production

UVOD

Izmed nestrukturnih ogljikovih hidratov je škrob najpomembnejša sestavina krme, ki zagotavlja energijo visoko produktivnim kravam molznicam in govejim pitancem. Razgradnja škroba v predželodcih poteka pod vplivom anaerobnih bakterij vrst *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteriodes ruminicola* in *Selenomonas ruminatium* (Huntington, 1997). Pri anaerobni fermentaciji škroba nastaja poleg hlapnih maščobnih kislin tudi mlečna kislina. Ob prekomernem zauživanju škroba se zaradi fermentacije začnejo kopičiti hlapne maščobne kisline in mlečna kislina, kar zniža pH predželodcev na raven, ki negativno vpliva na delovanje predželodcev, prirejo mleka in zdravje živali (Hoover in Miller-Webster, 1998). Hitrost in obseg razgradnje škroba v predželodcih sta odvisna od sestave obroka, količine zaužite krme, mehanične in kemične obdelave krme ter prilagoditve vampnih mikroorganizmov na substrat (Huntington, 1997). Na razgradnjo škroba v predželodcih lahko vplivamo z dodatki, kot so maščobe in maščobne kisline, formaldehid ali fenolne spojine, med katere prištevamo tudi tanine.

Tanini so razširjeni po vseh rastlinskih družinah. Najdemo jih tako v travniških rastlinah, kot tudi v grmovnih in drevesnih vrstah. Na splošno so tanini topni v vodi, vendar pa se topnost molekul s povečevanjem molekulske mase zmanjšuje (Lavrenčič, 2001). Zaradi velikega števila hidroksilnih skupin tvorijo tanini različne vrste vezi z beljakovinami, aminokislinami, ogljikovimi hidrati, kovinskimi ioni, vitamini, bakterijskimi celičnimi membranami in encimi vključenimi v razgradnjo beljakovin in ogljikovih hidratov (Mole in Waterman, 1987; Haslam, 1989; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003).

Tanine delimo na kondenzirane in hidrolizirajoče tanine. Kondenzirani tanini so oligomeri in polimeri flavanolnih enot (flavan-3-olov in flavan-4-diolov), povezanih z ogljikovimi vezmi, ki niso dovzetne na hidrolizo (Hagerman in Butler, 1991). Hidrolizirajoči tanini vsebujejo ogljikohidratno jedro (ponavadi D-glukozo), ki tvori estre z galno kislino (galotanini) ali heksahidroksidifensko kislino (elagitanini) (Mangan, 1988). Obe skupini taninov lahko vplivata na zdravje živali tako pozitivno kot negativno, kar je odvisno od vrste in koncentracije tanina v obroku, vrste živali ter fiziološkega stanja živali (Kumar in Vaithyanathan, 1990; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003). Nizke koncentracije taninov (pod 50 g/kg SS obroka) povečujejo sintezo mikrobnih beljakovin in zmanjšujejo razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev, zaradi česar se zmanjša količina izločenega dušika v okolje (Butter in sod., 1999; Makkar, 2003). Zaradi njihovega vpliva na delovanje mikroorganizmov se zmanjša tudi tvorba metana v predželodcih prežvekovalcev (Roth, 2003). Tanini v majhnih koncentracijah torej pozitivno vplivajo na prirejo mleka, mesa in volne, saj povečujejo tok esencialnih aminokislin v tanko črevo. Nasprotno pa so (pre)velike koncentracije tako kondenziranih kot tudi hidrolizirajočih taninov strupene. Presežke hidrolizirajočih taninov vampni mikroorganizmi lahko do neke mere razgradijo (Makkar, 2003), kar pa ne velja za kondenzirane tanine (McSweeney in sod., 2001).

Tvorba kompleksov med tanini in beljakovinami oz. aminokislinami je še vedno predmet številnih raziskav vpliva taninov na razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. Manj so se raziskovalci posvečali preučevanju vpliva taninov na razgradnjo oz. fermentacijo ogljikovih hidratov. Reed (1995) in McSweeney in sod. (2001) navajajo, da tanini tvorijo močne vodikove vezi s celulozo, hemicelulozo, škrobom ter pektini. Poleg tega pa se tanini vežejo na

mikrobne encime (beljakovine), ki so vključeni v presnovo ogljikovih hidratov (Makkar in sod., 1987, cit po. Butter in sod., 1999; McSweeney in sod., 2001), s čimer inhibirajo njihovo delovanje. Kljub temu antimikrobnemu delovanju, pa Scalbert (1991) navaja, da lahko številni mikroorganizmi v prisotnosti taninov normalno rastejo in se razvijajo.

In vitro produkcija plina je ena od tehnik, s katerimi ugotavljamo mikrobo aktivnost vampnih mikroorganizmov (Williams in sod., 2001). Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako različni taninski izvlečki v različnih koncentracijah vplivajo na kinetiko sproščanja plina pri *in vitro* fermentaciji čistega škroba oz. kako ti izvlečki vplivajo na amilolitično aktivnost vampnih mikroorganizmov.

MATERIAL IN METODE

In vitro fermentacijo škroba smo izvedli po metodi, ki jo navajata Menke in Steingass (1988), le da smo vampni sok odvzeli uro in pol po jutranjem krmljenju. Vampni dok smo odvzeli iz dveh fistuliranih kastriranih ovnov jezersko-solčavske pasme, ki smo jih krmili s senom (po volji), sestavljeno krmno mešanico (300 g dan⁻¹) in rudninsko vitaminsko mešanico (50 g dan⁻¹), ter tako pokrili vzdrževalne potrebe po hranljivih snoveh.

Krompirjev škrob (Art.št. 101252, Merck, Darmstadt, Nemčija) smo uporabili kot substrat za *in vitro* fermentacijo. Pred inkubacijo smo škrobu primešali tri različne taninske izvlečke: kostanjev tanin (farmatan 75[®] (F75); Tanin Sevnica, Slovenija), taninsko kislino (TAK; Sigma-Aldrich, Nemčija) in kebračo tanin (QUE; Roy Wilson Dickson, Velika Britanija) v koncentracijah 0 (kontrola), 0,33, 0,67 in 1,33 mg ml⁻¹ medija.

V brizgalke smo zatehtali 175 mg substrata in dodali ustrezno količino taninskega izvlečka. Substratu s taninskim izvlečkom ali brez njega smo nato dodali še 30 ml mešanice vampnega soka in pufru (10 ml vampnega soka in 20 ml pufru) ter jih postavili v vodno kopel ogreto na 39 ± 0,5 °C. Vsako kombinacijo substrata in taninskega izvlečka v različnih koncentracijah smo izvedli v treh ponovitvah. Skupaj z vzorci smo inkubirali tudi slepe vzorce (brizgalke brez vzorca) in vzorec standardnega krmila (seno mnogocvetne ljuljke), s katerim smo primerjali aktivnosti vampnega soka med posameznimi serijami.

Prostornino sproščenega plina smo odčitali 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 in 96 ur po začetku inkubacije.

Kazalnike *in vitro* fermentacije škroba smo ocenili za vsako kombinacijo koncentracije in vrste taninskega izvlečka s pomočjo Gompertzove funkcije (Bidlack in Buxton, 1992; Lavrenčič in sod., 1997):

$$y(t) = B e^{-C} e^{-At}, \quad [1]$$

kjer je »y« produkcija plina (ml) v času inkubacije »t«, »B« skupna potencialna produkcija plina (ml g⁻¹ SS), »C« specifična hitrost fermentacije, na katero vpliva konstantni faktor »A«, s katerim označujemo faktor mikrobne (ne)učinkovitosti. Kazalnike B, C in A smo ocenili kot nelinearno regresijo (PROC NLIN) v statističnem programskem paketu SAS (SAS, 2001).

Spremembe v hitrosti fermentacije smo ocenili s prvim odvodom Gompertzove funkcije po času »t«:

$$\frac{dy}{dt} = B C A e^{-At} e^{-C} e^{-At}. \quad [2]$$

Z drugim odvodom Gompertzove funkcije po času, ki smo ga izenačili z nič (0) in rešili po času »t«, smo izračunali čas največje hitrosti fermentacije (h; ČNHF):

$$\frac{d^2y}{dt^2} = AB^2C^2(e^{-At})^2 e^{-Ce^{-At}} - ABC^2 e^{-Ce^{-At}} = 0. \quad [3]$$

Največjo hitrost fermentacije (ml h^{-1} ; NHF) smo izračunali tako, da smo ustrezne ČNHF vstavili v prvi odvod Gompertzove funkcije.

Za substrat z vsako kombinacijo koncentracije in vrste taninskega izvlečka smo s pomočjo kazalnikov fermentacije izračunali tudi časovni zaostanek začetka fermentacije (h ; LAG):

$$LAG = \frac{\log(C) - 1}{A}. \quad [4]$$

Ocenjene kazalnike fermentacije (B , C in A) ter izračunane kazalnike ČNHF, NHF in LAG smo analizirali z metodo najmanjših kvadratov v proceduri GLM (General Linear Model):

$$y_{ijk} = \mu + T_i + K_j + TK_{ij} + e_{ijk},$$

kjer je » y_{ijk} « opazovana vrednost, » μ « srednja vrednost, » T_i « sistematski vpliv vrste taninskega izvlečka, » K_j « sistematski vpliv koncentracije taninskega izvlečka ter » TK_{ij} « interakcija med taninskim izvlečkom in koncentracijo taninskega izvlečka. Statistično značilne razlike ($p < 0,05$) med vrstami in koncentracijami posameznega taninskega izvlečka smo ovrednotili s pomočjo Tukey-Kramer testa (SAS, 2001).

REZULTATI

Vpliv taninskega izvlečka

V preglednici 1 so predstavljeni ocenjeni kazalniki fermentacije škroba. Na vse tri ocenjene kazalnike fermentacije sta statistično značilno ($p < 0,01$) vplivala tako vrsta kot koncentracija taninskega izvlečka. Poleg vrste in koncentracije taninskega izvlečka je na ocenjene kazalnike fermentacije vplivala ($p < 0,001$) tudi interakcija med vrsto taninskega izvlečka in njegovo koncentracijo.

Dodatka taninskih izvlečkov F75 in QUE v medij sta skupno potencialno produkcija plina iz škroba v primerjavi s kontrolo zmanjšala. Najbolj je skupno potencialno produkcijo plina zmanjšal dodatek QUE (za $54,2 \text{ ml g}^{-1} \text{ SS}$), medtem ko je dodatek F75 zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina za $20,6 \text{ ml g}^{-1} \text{ SS}$. Ravno nasprotno pa je dodatek taninske kisline (TAK) skupno potencialno produkcijo plina povečal od $528,4 \text{ ml g}^{-1} \text{ SS}$ (kontrola) na $560,5 \text{ ml g}^{-1} \text{ SS}$ (pregl. 1).

Specifična hitrost fermentacije škroba (C) brez dodanega taninskega izvlečka je bila $10,1$ (pregl. 1). Dodatek QUE in TAK sta specifično hitrost fermentacije škroba zmanjšala na $7,6$ (QUE) in $8,4$ (TAK), medtem ko je specifična hitrost fermentacije ob dodanem F75 ostala bolj ali manj nespremenjena ($10,8$).

Konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti (A) škroba ($0,260$) se je dodajanjem taninskih izvlečkov zmanjšal za 30% ob dodatku TAK, 23% ob dodatku QUE in 14% ob dodatku F75 (pregl. 1).

V preglednici 2 so predstavljeni izračunani kazalniki fermentacije škroba. Na izračunane kazalnike fermentacije (LAG, ČNHF in NHF) sta statistično značilno ($p < 0,05$) vplivala vrsta in koncentracija taninskega izvlečka. Enako kot pri ocenjenih kazalnikih fermentacije je tudi

interakcija med vrsto taninskega izvlečka in njegovo koncentracijo statistično značilna ($p < 0,01$).

Preglednica 1. Ocenjeni kazalniki fermentacije po inkubaciji z različnimi vrstami in koncentracijami taninskih izvlečkov

Table 1. Estimated kinetic parameters after incubation with different types and concentrations of tannins extracts

	Ocenjeni kazalniki fermentacije / Estimated kinetic parameters								
	B (ml g ⁻¹ SS) [†]			C [†]			A [†]		
	B (ml g ⁻¹ DM)								
	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK
Koncentracija TI [‡]									
Concentration TE									
0		528,4 ^{a†}			10,1 ^a			0,260 ^a	
1	504,8 ^{bA}	503,7 ^{bA}	537,3 ^{acB}	6,1 ^{bA}	9,3 ^{aB}	6,6 ^{bA}	0,130 ^{bA}	0,186 ^{bB}	0,120 ^{bA}
2	511,0 ^{bA}	462,2 ^{cB}	581,5 ^{bcC}	15,9 ^{cA}	7,1 ^{bB}	11,0 ^{aB}	0,308 ^{cA}	0,213 ^{cB}	0,266 ^{aC}
3	507,6 ^{bA}	456,6 ^{cB}	562,7 ^{bcC}	10,5 ^{aA}	6,4 ^{bB}	7,5 ^{bAB}	0,234 ^{dA}	0,199 ^{bcAB}	0,164 ^{bB}
SDO [§] / RMSE		9,26			1,06			0,01	
Statistična značilnost									
Statistical significance									
Taninski izvleček (T)		***			***			***	
Tannin extract (T)		***			***			***	
Koncentracija TI (K)		**			***			***	
Concentration TE (K)		**			***			***	
TI × K		***			***			***	
TE × K		***			***			***	

[†] B – skupna potencialna produkcija plina / total potentially gas production, C – specifična hitrost fermentacije / relative degradation rate, A – konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti / constant decay in relative degradation rate;

[‡] 0 – kontrola / control, 1 – 0,33 mg ml⁻¹ medija / 0.33 mg ml⁻¹ medium, 2 – 0,67 mg ml⁻¹ medija / 0.67 mg ml⁻¹ medium, 3 – 1,33 mg ml⁻¹ medija / 1.33 mg ml⁻¹ medium;

[§] SDO – standardni odklon ostanka / RMSE – root mean square error;

^{abcd} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$) / means in a column differ significantly ($p < 0,05$);

^{ABCD} vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$) / means in a row differ significantly ($p < 0,05$);

Dodatek taninskih izvlečkov je glede na kontrolo podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) škroba (pregl. 2). LAG je bil najkrajši ob dodatku QUE (5,1 ure) in najdaljši ob dodatku TAK (6,3 ure). LAG je bil ob dodatku TAK v povprečju za 20 % daljši od izračunanega za kontrolo (5,0 ure).

Škrob brez dodatkov taninskih izvlečkov je najhitreje fermentiral 8,9 ure po začetku inkubacije, ko se je sprostil 50,6 ml/uro (pregl. 2 in slika 1). Najkasneje je največjo hitrost fermentacije škrob dosegel z dodatkom TAK (12,5 h), medtem ko je dodatek F75 in QUE v medij čas največje hitrosti fermentacije (ČNHF) podaljšal za največ dve uri.

Največja hitrost fermentacije (NHF) škroba je se je z dodatkom taninskih izvlečkov zmanjšala (pregl. 2 in slika 1). V primerjavi s kontrolo (50,6 ml h⁻¹) je najmanjši vpliv na NHF imel dodatek F75 (42,0 ml h⁻¹), kateremu sta sledila dodatka TAK (38,1 ml h⁻¹) ter QUE (34,7 ml h⁻¹).

Vpliv koncentracije taninskega izvlečka

S povečevanjem koncentracije posameznih taninskih izvlečkov se skupna potencialna produkcija plina zmanjšuje. V primerjavi s kontrolo (528,4 ml g⁻¹ SS) je dodatek 1,33 mg QUE

ml⁻¹ medija najbolj zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina (456,6 ml g⁻¹ SS), medtem ko se skupna potencialna produkcija plina pri različnih koncentracijah F75 ni statistično značilno spremenila. Za razliko od QUE in F75 pa je v primerjavi s kontrolo dodatek TAK povečal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba, ki je do koncentracije 0,67 mg TAK ml⁻¹ medija naraščala (581,5 ml g⁻¹ SS), pri največji koncentraciji pa se je zmanjšala na 562,7 ml g⁻¹ SS. Taninska izvlečka F75 in QUE sta imela enak učinek na skupno potencialno produkcijo plina pri koncentraciji 0,33 mg ml⁻¹ medija (pregl. 1). Pri večjih koncentracijah (0,67 in 1,33 mg ml⁻¹ medija) je QUE statistično značilno zmanjšal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba.

Preglednica 2. Izračunani kazalniki fermentacije po inkubaciji z različnimi vrstami in koncentracijami taninskih izvlečkov

Table 2. Calculated kinetic parameters after incubation with different types and concentrations of tannins extracts

	Izračunani kazalniki fermentacije								
	Calculated kinetic parameters								
	LAG (h) [†]			ČNHF (h) [†]			NHF (ml h ⁻¹) [†]		
	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK	F75	QUE	TAK
Koncentracija TI [‡]									
Concentration TE									
0		5,0 ^{a†}			8,9 ^a			50,6 ^a	
1	6,1 ^{bA}	6,6 ^{bB}	7,4 ^{bC}	13,8 ^{bA}	12,0 ^{bB}	15,8 ^{bC}	24,2 ^{bA}	34,4 ^{bB}	23,6 ^{bA}
2	5,7 ^{abA}	4,5 ^{cB}	5,2 ^{aA}	8,9 ^a	9,2 ^a	9,0 ^a	58,0 ^{cA}	36,2 ^{bB}	56,9 ^{aA}
3	5,7 ^{abA}	4,3 ^{cB}	6,2 ^{cA}	10,0 ^c	9,3 ^a	12,6 ^c	43,8 ^d	33,4 ^b	33,8 ^b
SDO [§] / RMSE		0,28			0,74			2,82	
Statistična značilnost									
Statistical significance									
Taninski izvleček (TI)		***			***			**	
Tannin extract (TE)									
Koncentracija TI (K)		***			***			***	
Concentration TE (K)									
TI × K		***			**			***	
TE × K									

[†] LAG – časovni zaostanek začetka fermentacije (h) / lag phase (h), ČNHF – čas največje hitrosti fermentacije (h) / TMFR – time of maximum fermentation rates (h), NHF – največja hitrost fermentacije (ml h⁻¹) / MFR – maximum fermentation rate (ml h⁻¹);

[‡] 0 – kontrola / control, 1 – 0,33 mg ml⁻¹ medija / 0.33 mg ml⁻¹ medium, 2 – 0,67 mg ml⁻¹ medija / 0.67 mg ml⁻¹ medium, 3 – 1,33 mg ml⁻¹ medija / 1.33 mg ml⁻¹ medium;

[§] SDO – standardni odklon ostanka / RMSE – root mean square error;

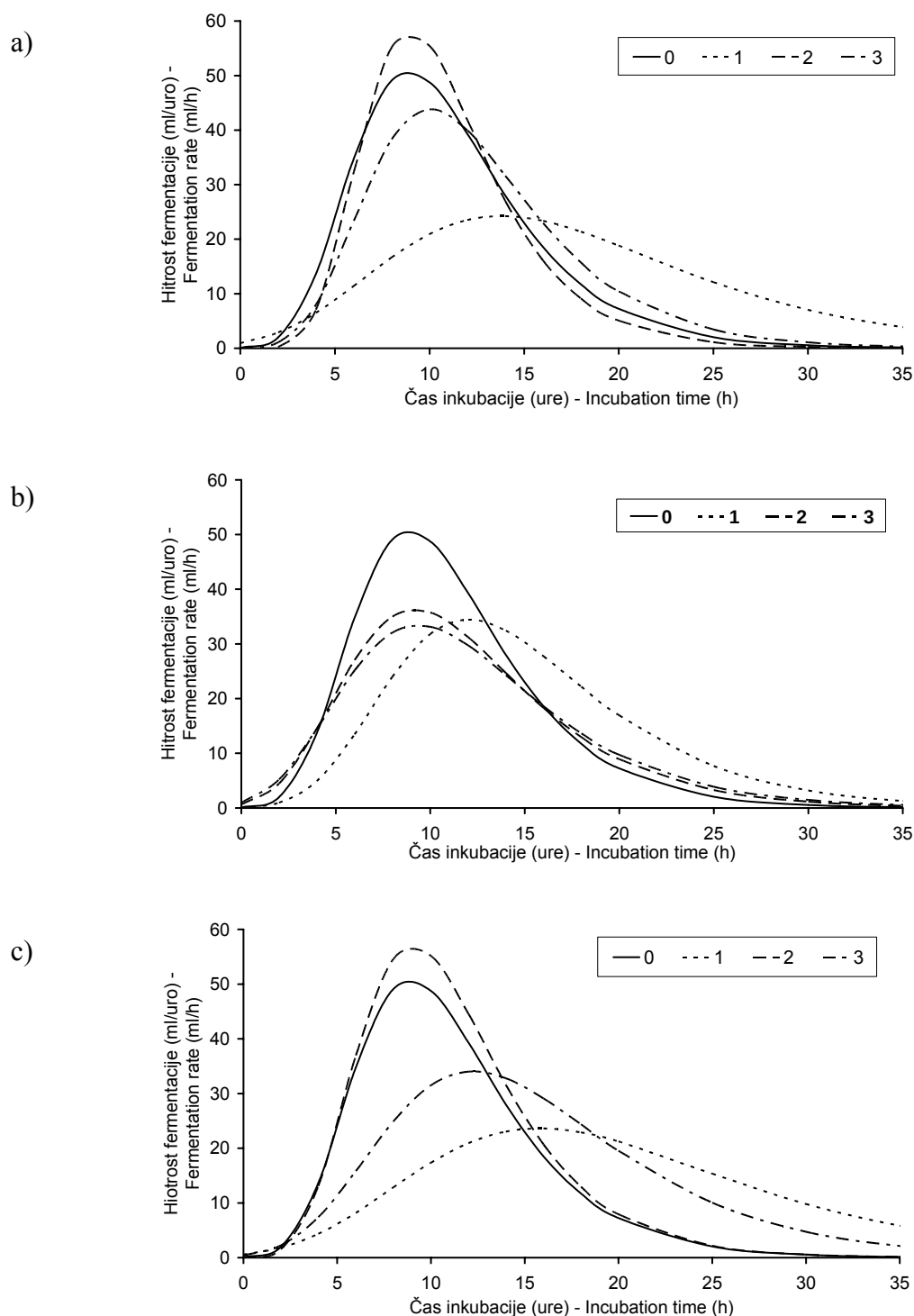
^{abcd} vrednosti v stolpcih se statistično značilno razlikujejo (p < 0,05) / means in a column differ significantly (P < 0.05);

^{ABCD} vrednosti v vrsticah se statistično značilno razlikujejo (p < 0,05) / means in a row differ significantly (P < 0.05);

Pri koncentraciji F75 in TAK 0,33 mg ml⁻¹ medija je bila specifična hitrost fermentacije škroba statistično značilno manjša (6,1 za F75 in 6,6 za TAK) od škroba, brez dodanega taninskega izvlečka. Specifična hitrost fermentacije se je s povečanjem koncentracije F75 in TAK povečala na 15,9 in 11,0, potem pa upadla na 10,5 in 7,5. S povečevanjem koncentracije QUE se je specifična hitrost fermentacije škroba zmanjšala od 9,3 pri koncentraciji 0,33 mg ml⁻¹ medija na 6,4 pri 1,33 mg ml⁻¹ medija.

Na konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti najbolj vplivajo najmanjše koncentracije taninskih izvlečkov (pregl. 1). Z naraščanjem koncentracije taninskega izvlečka do koncentracije

0,67 mg ml⁻¹ medija narašča tudi konstantni faktor mikrobne (ne)učinkovitosti, ki pa se pri največji koncentraciji ponovno zmanjša.



Slika 1. Hitrost fermentacije škroba pri različnih koncentracijah taninskih izvlečkov a) F75, b) QUE in c) TAK (0 – kontrola, 1– 0,33 mg ml⁻¹; 2 – 0,67 mg ml⁻¹ in 3 – 1,33 mg ml⁻¹ medija).

Figure 1. Starch fermentation rate at different tannin extract concentrations a) F75, b) QUE and c) TAK (0 – control, 1 – 0.33 mg ml⁻¹; 2 – 0.67 mg ml⁻¹ in 3 – 1.33 mg ml⁻¹ of medium).

V primerjavi s škrobom brez dodanega taninskega izvlečka je koncentracija 0,67 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija podaljšala časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) v povprečju za 2 %, medtem ko je koncentracija 1,33 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija podaljšala LAG za 7 %. LAG se je ob dodatku F75 in QUE skrajšal, vendar je bil pri vseh koncentracijah F75 daljši kot LAG kontrole, medtem ko se je bil pri največjih koncentracijah QUE statistično značilno krajši od kontrole (pregl. 2). Ob uporabi 0,33 mg TAK ml⁻¹ medija je bil LAG v primerjavi s kontrolo statistično značilno daljši, nato pa se je skrajšal na 6,2 ure.

Daljši časovni zaostanek začetka fermentacije je vplival tudi na čas največje hitrosti fermentacije (ČNHF; pregl. 2 in slika 1). Ob dodajanju različnih koncentracij taninskih izvlečkov se je čas največje hitrosti fermentacije škroba podaljšal. Najdaljši ČNHF smo izračunali za škrob, ki smo ga inkubirali s taninskimi izvlečki v koncentraciji 0,33 mg ml⁻¹ medija (13,8 ure za F75, 12,0 ure za QUE in 15,8 ure za TAK). ČNHF je bil pri koncentraciji 0,67 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija enak kot pri kontroli. Pri koncentraciji 1,33 mg taninskega izvlečka ml⁻¹ medija sta se glede ČNHF od kontrole statistično razlikovala samo F75 in TAK. ČNHF se med taninskimi izvlečki pri koncentracijah 0,67 in 1,33 mg ml⁻¹ medija ni statistično značilno razlikoval.

Pri koncentraciji 0,67 mg ml⁻¹ medija se največja hitrost fermentacije (NHF; 50,4 ml h⁻¹) ni statistično značilno razlikovala od kontrole (50,6 ml h⁻¹). V primerjavi s kontrolo pa je bila NHF statistično značilno manjša (27,4 ml h⁻¹) pri koncentraciji taninskih izvlečkov 0,33 mg ml⁻¹ medija (pregl. 2 ter slike 1, 2 in 3). Pri koncentraciji 0,67 mg ml⁻¹ medija F75 (58,0 ml h⁻¹) in TAK (56,9 ml h⁻¹) je bila NHF večja kot kontrola, medtem ko so bile NHF pri največji koncentraciji statistično značilno manjše kot pri kontroli.

RAZPRAVA

Taninska izvlečka F75 in QUE sta zmanjšala *in vitro* produkcijo plina med anaerobno inkubacijo škroba. Do podobnih rezultatov je z istima vrstama izvlečkov prišla tudi Roth (2003). Zmanjšan obseg fermentacija škroba v prisotnosti taninov v primerjavi s kontrolo je najverjetneje posledica tvorbe kompleksov med tanini in škrobom (Butter in sod., 1999; McSweeney in sod., 2001; Makkar, 2003) oziroma povezava taninov z vampnimi mikroorganizmi (Jones in sod., 1994) in/ali njihovimi encimi, ki so vključeni v fermentacijo škroba (Makkar in sod., 1987, cit. po Butter in sod., 1999). Martínez in sod. (2006) navajajo, da tanini kebrača in taninska kislina ne inhibirajo vezave mikroorganizmov na škrobna zrna, ampak zmanjšujeta hidrolizo škroba tako, da zmanjšujeta razgradnje beljakovinske ovojnice škrobnih zrn. TAK je za razliko od F75 in QUE povečal skupno potencialno produkcijo plina iz škroba. Ti rezultati so v skladu z rezultati, ki jih navajajo Nelson in sod. (1995) ter Singh in sod. (2001). To pomeni, da taninska kislina ne inhibira mikrobne aktivnosti. To sta potrdila tudi O'Donovan in Brooker (2001), ki sta gojila bakterijo *Streptococcus gallolyticus* v prisotnosti taninske kisline in ugotovila, da ta bakterija normalno raste tudi pri koncentraciji 7 % (w/v) taninske kisline. Nelson in sod (1995) je preučeval rast vampnih anaerobnih bakterij in ugotovil, da so rasle neovirano pri koncentraciji 3 % (w/v) taninske kisline, kar je kar trikrat večja koncentracija od tiste, ki smo jo uporabili v našem poskusu. Čeprav mnogi avtorji poročajo o zmanjševanju produkcije plina zaradi povečevanja koncentracije taninskih izvlečkov (Longland in sod., 1995; Zimmer in Cordesse, 1996; Lavrenčič, 2001; Roth, 2003), tega trenda v naši raziskavi nismo mogli dokazati za vse preučevane taninske izvlečke (pregl. 1). Silanikove in sod. (2001) ter Reed (1995) navajajo, da je vezava taninov na ogljikove hidrate in beljakovine odvisna od lastnosti taninov in lastnosti substratov, ki jih opredeljujejo molekulska masa, terciarna struktura, izoelektrična točka in kompatibilnost mest za vezavo. Tudi to je lahko razlog, da se naši rezultati razlikujejo od objavljenih v strokovni literaturi.

Časovni zaostanek začetka fermentacije (LAG) je faza prilagajanja mikroorganizmov na novo okolje in poselitev mikroorganizmov na substrat. Dodatek taninskih izvlečkov je podaljšal časovni zaostanek začetka fermentacije škroba (pregl. 2). O'Donovan in Brooker (2001) sta opazila, da je začetek rasti *Streptococcus gallolyticus* in *Streptococcus bovis* odložen ob dodatku taninske kisline. Roth (2003) poroča, da je časovni zaostanek začetka fermentacije graha podaljšan s povečevanjem koncentracije taninskega izvlečka mimoze (kondenziran tanin). Daljši časovni zaostanek začetka fermentacije je verjetno posledica vezave taninskih izvlečkov na mikrobne encime. Ker se tanini vežejo tudi na substrat, le ta postane nedostopen za encime, ki razkrajajo ogljikove hidrate (Scalbert, 1991; McSweeney in sod., 2001; Kumar in Singh, 1984). O'Donovan in Brooker (2001) menita, da je daljši časovni zaostanek začetka fermentacije substrata lahko posledica tvorbe zaščitnega sloja na površini mikroorganizmov. Ta sloj sestavljajo predvsem glikoproteini, ki imajo veliko afiniteto do taninov. Vendar pa tvorba kompleksov med glikoproteini zaščitnega sloja in tanini prepreči predvsem vezavo taninov na mikrobne encime (Scalbert, 1991; McSweeney in sod., 2001), zato tanini ne bi smeli bistveno vplivati na časovni zaostanek začetka fermentacije.

Najhitreje je škrob fermentiral po 9 urah inkubacije ter dosegel hitrost $50,6 \text{ ml h}^{-1}$ (pregl. 2 in slika 1). Dodatek taninskih izvlečkov je podaljšal čas največje hitrosti fermentacije škroba in zmanjšal največjo hitrost fermentacije škroba. Najmanjši učinek na največjo hitrost fermentacije škroba je imel kostanjev tanin (Farmatan 75), največjega pa dodatek kebračo taninov (QUE). Roth (1993) je primerjala kinetike *in vitro* fermentacije sojinih tropin v prisotnosti taninskih izvlečkov in ugotovila, da kostanjev tanin (farmatan) upočasni fermentacijo sojinih tropin bolj kot pa tanini kebrača in mimoze. Manjšo hitrost *in situ* razgradnje travniškega sena v prisotnosti kostanjevih taninov sta ugotovila tudi Zimmer in Cordesse (1996). Hervás in sod. (2003) so ugotavljali potek *in vitro* fermentacije voluminozne krme ob dodatku različnih koncentracij taninov kebrača in ugotovili, da se hitrost fermentacije s povečevanjem koncentracije taninskega izvlečka zmanjšuje. Do podobnih rezultatov *in vitro* so prišli tudi Makkar in sod. (1995), ki so dokazali, da se obseg in hitrost razgradnje travniškega sena s povečevanjem koncentracije taninov kebrača zmanjšuje.

SKLEPI

Dodatek taninskih izvlečkov je spremenil potek *in vitro* fermentacije škroba. Pri tem se zmanjšata prostornina proizvedenega plina in hitrost fermentacije. Vrsta in koncentracija taninskega izvlečka sta imela močan vpliv ($p < 0,01$) na skupno potencialno produkcijo plina. Dodatek taninskih izvlečkov je podaljšal začetek fermentacije škroba za največ dve uri ($0,33 \text{ mg ml}^{-1} \text{ TAK}$). Največjo hitrost fermentacije ($50,6 \text{ ml h}^{-1}$) škroba smo zabeležili po skoraj 9. urah od začetka fermentacije. Z dodatkom taninskih izvlečkov se je največja hitrost fermentacije zmanjšala, podaljšal pa se je čas, v katerem je škrob najhitreje fermentiral. S povečevanje koncentracije taninskih izvlečkov se zmanjšujeta skupna potencialna produkcija plina in največja hitrost fermentacije ter podaljšujeta časovni zaostanek začetka fermentacije in čas, v katerem je škrob najhitreje fermentiral.

SUMMARY

Starch is the major energy component in ruminant nutrition. Rate and extent of starch digestion in the rumen are affected by different factors, including source of dietary starch, diet composition, amount of feed consumed, mechanical in chemical alterations and degree of adaptation of rumen microbiota to the diet (Huntington, 1997). Additives such as dietary fat or treatment with formaldehyde or phenolic substances, such as tannins, reduce the rate and extent

starch fermentation in the rumen (Huntington, 1997). Condensed and hydrolysable tannins are capable to form complexes with proteins, amino acids, carbohydrates, metal ions, vitamins, bacterial cell membranes and their enzymes (Mole in Waterman, 1987; Butter in sod., 1999; Makkar, 2003). These complexes are often resistant to microbial attack. The objective of the present work was to investigate effect of different types and concentrations of tannins extracts on extent and rate of starch fermentation.

Potato starch (Merck, Darmstadt, Germany) was used as a substrate and to it three different tannin extracts were added. Chestnut tannin (F75; Tanin Sevnica, Slovenia) and tannic acid (TAK; Sigma-Aldrich, Germany) were members of hydrolysable tannins, whilst quebracho tannin (QUE; Roy Wilson Dickson, Great Britian) belongs to condensed tannin. Concentrations of added tannin extracts were control (0), 0.33 mg ml⁻¹ medium (1), 0.67 mg ml⁻¹ medium (2) and 1.33 mg ml⁻¹ medium (3). In vitro gas production method was performed according to Menke and Steingass (1988). Rumen liquor was taken from two fistulated and castrated adult Jezersko-Solčavska male sheep fed to their maintenance requirements with hay (ad libitum), compound feed (300 g dan⁻¹) and vitamin-mineral supplement (50 g dan⁻¹). Measurements of produced gas were taken 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72 and 96 hours after the start of incubation.

Gompertz model was used for the determination of total potentially gas production (B), relative degradation rate (C) and constant (A) describing the decay in relative degradation rate. First and second derivatives of Gompertz equation were used to calculate the maximum fermentation rate (MFR) and the time of maximum fermentation rate (TMFR).

Compared to control (528.4 ml g⁻¹ DM) F75 (507.8 ml g⁻¹ DM) and QUE (474.2 ml g⁻¹ DM) decreased total potential gas production (B) of starch (table 1). On contrary, TAK increased the total potential gas production of starch for 6% (560.5 ml g⁻¹ DM). Fermentation of starch started (LAG) after five hours of incubation (table 2). Tannin extracts extended the LAG. Maximum fermentation rate (MFR) of starch occurred after almost 9 hours. Addition of F75, QUE and TAK extended TMFR to 10.9, 10.2 and 12.5 hours, respectively. Maximum fermentation rate of starch was very high (50.6 ml h⁻¹). Addition of tannin extracts reduced MFR of starch to 42 ml h⁻¹ (F75), 38.1 ml h⁻¹ (TAK) and 34.7 ml h⁻¹ (QUE). These results suggest that tannin extracts with their ability to bind to microorganisms, their enzymes and substrate alter the kinetics of *in vitro* starch fermentation.

VIRI

- Bidlack, J. E./ Buxton, D. R. Content and deposition rates of cellulose, hemicellulose, and lignin during regrowth of forage grasses and legumes. *Canadian Journal of Plant Science*, 72(1992), 809–818.
- Butter N.L./ Dawson J.M., Buttery P.J. Effects of dietary tannins on ruminants. V: Secondary plant products: antinutritional and beneficial actions in animal feeding (ur.: Caygill J.C./ Mueller-Harvey I.). Nottingham, Nottingham University Press, 1999, 51–72.
- Hagerman A.E./ Butler L.G. Tannins and Lignins. V: Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites (ur.: Rosenthal G.A./ Berenbaum M.R.). California, Academic Press Inc., 1991, 355–383.
- Haslam E. Plant polyphenols: vegetable tannins revisited. Cambridge, Cambridge University Press, 1989, 230 str.
- Hervás G./ Frutos P./ Javier Giráldez F./ Mantecón A.R./ Álvarez Del Pino M.C. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 109(2003), 65–78.
- Huntington G.B. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *Journal of Animal Science*, 75(1997), 852–867.
- Hoover W.H./ Miller-Webster T.K. Role of sugars and starch in ruminal fermentation. V: Tri-State Dairy Nutrition Conference (ur.: Eastridge M.L.). 1998-04-21/22. Ft. Wajne, ZDA, 1998, 1–16.
- Jones G.A./ McAllister T.A./ Muir A.D./ Cheng K.-J. Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1994)4, 1374–1378.

- Kumar R./ Singh M. Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(1984), 447–453.
- Kumar R./ Vaithyanathan S. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 30(1990), 21–38.
- Lavrenčič A. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. V: 9. tradicionalno posvetovanje Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali, Podčetrtek, 2001-03-22. Sevnica, Tanin, 2001, 39–47.
- Lavrenčič, A./ Stefanon, B./ Susmel, P. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. *Animal Science*, 64(1997), 423–431.
- Longland A.C./ Theodorou M.K./ Sanderson R./ Lister S.J./ Powell C.J./ Morris P. Non-starch polysaccharide composition and *in vitro* fermentability of tropical forage legumes varying in phenolic content. *Animal Feed Science and Technology*, 55(1995), 161–177.
- Makkar H.P.S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaption to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49(2003), 241–256.
- Makkar H.P.S./ Blümmel M./ Becker K. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69(1995), 481–493.
- Mangan J.L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1(1988), 209–231.
- Martínez T.F./ McAllister T.A./ Wang Y./ Reuter T. Effects of tannic acid and quebracho tannins on *in vitro* ruminal fermentation of wheat and corn grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2006), 1244–1256.
- McSweeney C.S./ Palmer B./ McNeill D.M./ Krause D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(2001), 83–93.
- Menke K.H./ Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28(1988), 7–55.
- Mole S./ Waterman P.G. Tannic acid and proteolytic enzymes: enzyme inhibition or substrate deprivation? *Phytochemistry*, 26(1987)1, 99–102.
- Nelson K.E./ Pell A.N./ Schofield P./ Zinder S. Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolyzable tannins. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1995)9, 3293–3298.
- O'Donovan L./ Brooker J.D. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. *Microbiology*, 147(2001), 1025–1033.
- Perez-Maldonado R.A./ Norton B.W. The effects of condensed tannins from *Desmodium intortum* and *Calliandra calothyrsus* on protein and carbohydrate digestion in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*, 76(1996), 515–533.
- Reed J.D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73(1995), 1516–1528.
- Roth S. Reducing methane emission and optimising N-supply in ruminants by treating feeds with tannins. Doctoral Dissertation. Aachen, Schaker Verlag, 2003, 155 str.
- Salawu M.B./ Acamovic T./ Stewart C.S./ Hovell F.D.DeB. Quebracho tannins with or without Browse Plus (a commercial preparation of polyethylene glycol) in sheep diets: effect on digestibility of nutrients *in vivo* and degradation of grass hay *in sacco* and *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 69(1997), 67–78.
- Statistical Analysis Systems Institute Inc. The SAS System for Windows, Release 8.02. Cary, NC, USA, 2001.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(1991)12, 3875–3883.
- Silanikove N./ Perevolotsky A./ Provenza F.D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91(2001), 69–81.
- Singh B./ Bhat T.K./ Sharma O.P. Biodegradation of tannic acid in an *in vitro* ruminal sistem. *Livestock Production Science*, 68(2001), 259–262.
- Zimmer N./ Cordesse R. Digestibility and ruminal digestion of non-nitrogenous compounds in adult sheep and goats: Effects of chestnut tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 61(1996), 259–273.
- Williams, B./ Verstegen, M.W.A./ Tamminga, S. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews*, 14(2001), 207–227.

PROBLEMATIKA TERMINOV »PROSTOŽIVEČE«, »GOJENE« IN »REJNE« ŽIVALI V SLOVENSKI ZAKONODAJI

Aleksandra ŽIGO JONOZOVIČ^{a)}

^{a)} LUTRA, Inštitut za ohranjanje naravne dediščine, Opekarska 11, 1000 Ljubljana, Slovenija, mag., e-pošta: aleksandra.lutra@siol.net.

Delo je prispelo 31. julija 2007, sprejeto 26. novembra 2007.

Received July 31, 2007, accepted November 26, 2007.

IZVLEČEK

Biotska raznovrstnost v kmetijstvu zajema, med drugim, prostoživeče živali, s katerimi upravlja človek. Posamezne osebkke lahko redimo, gojimo ali vzrejamo za proizvodnjo hrane, volne, kož, krzna oz. druge gospodarske namene, ali pa za družbo, rekreacijo, varstvo ali pomoč človeku. Odvisno od tega jih različno obravnavamo. Za pravno ureditev področja rabimo jasno opredeljene in usklajene termine. V Sloveniji na področju gojenja oz. reje prostoživečih živali ni zakona, ki bi dejavnost celovito urejal, zato je bilo težišče raziskave na rabi terminov: živali (divjad) v ujetništvu, gojene živali (gojena) divjad, rejne živali oz. živali (divjad) v reji, znotraj predpisov, ki se vsebinsko prekrivajo. S pregledom dokumentov sem ugotovila, da raba omenjenih terminov v slovenski zakonodaji ni usklajena. Termine je potrebno uskladiti in doreči, pri čemer je bistveno upoštevati način rabe živali. Na podlagi sinteze ugotovitev sta oblikovana predloga za razdelitev in rabo proučevanih terminov ter osnovno spremembo predpisov. Oblikovan je tudi shematski prikaz vsebinskih razlik med predlaganimi termini.

Ključne besede: zakonodaja / predpisi / terminologija / prostoživeče živali / ujetništvo / gojenje / reja

THE USE OF TERMS WILD, BRED AND FARMED ANIMALS IN SLOVENE LEGISLATION

ABSTRACT

Agricultural biodiversity includes, among other, wild animal species that are used or may be used for the production of food. Animals may be farmed or bred for food, wool, leather, fur skin or for other economic purposes, but we can also breed them for company, recreation, protection or work. The purpose of farming and breeding is crucial for setting of criteria for handling individual animal or a group of them. Legal purposes request precise and harmonised terminology. The paper deals with the use of terms such as animals of wild species kept in captivity, bred (game) animals, farmed (game) animals in Slovene regulation. In Slovene legislation there is no single act which holistically regulates breeding and farming of animals of wild species. The use of terms in regulations which partially deal with the subject is not harmonised and does not fully take into consideration the use of animals. The article gives the suggestions for subdivision and use of studied terms as well as changes of some legislation acts. The schematic representation of core differences between terms under consideration is presented.

Key words: legislation / regulations / terminology / wild animals / captivity / breeding / farming

UVOD

Človek je tako kot živali sestavni del narave ter, tako kot one, za svoje potrebe izkorišča sestavine svojega okolja in jih uporablja v različne namene. Če se omejimo samo na živi del

okolja ugotovimo, da je od raznovrstnosti le-tega, torej od biotske raznovrstnosti, odvisna potencialna stopnja zadovoljevanja njegovih potreb. Del biotske raznovrstnosti, ki ima določen pomen za kmetijstvo in pridobivanje hrane, imenujemo kmetijska biotska raznovrstnost ali s tujko agrobiodiverziteteta. Njen sestavni del so tudi prostoživeče rastline in živali, s katerimi upravlja človek.

Živali lahko s stališča človekovega vpliva na njihove lastnosti razdelimo na dve skupini: domače živali in prostoživeče vrste. V novejšem času govorimo tudi o tretji skupini, in sicer o gensko spremenjenih organizmih oz. živalih (GSO). Posamezne osebkke iz teh skupin lahko redimo, gojimo ali vzrejamo za proizvodnjo hrane, volne, kož, krzna ali v druge gospodarske namene, ali pa za družbo, rekreacijo, varstvo ali pomoč pri delu. Dejstvo je, da jih odvisno od tega različno obravnavamo.

Pri proučevanju predpisov, ki urejajo področje rabe naravnih virov v kmetijstvu, sem se srečevala s pojmi, ki so različno definirani ter velikokrat med seboj hierarhično neusklajeni, kar povzroča določeno pravno neurejenost in negotovost. Za pravno ureditev katerega koli področja pa rabimo, med drugim, tudi jasno opredeljene in usklajene pojme.

V nadaljevanju bom predstavila pomembnejše predpise, ki urejajo ravnanje z gojenimi in rejnimi živalmi predvsem prostoživečih vrst, predstavila bom problematiko rabe določenih terminov, podala predlog njihove opredelitve in rabe ter razložila njihove vsebinske razlike.

NAMEN IN METODE DELA

Težišče raziskave je raba terminov znotraj slovenskih predpisov, zlasti: živali (divjad) v ujetništvu, gojene živali (gojena divjad), rejne živali oz. živali (divjad) v reji.

Na področju gojenja oz. reje prostoživečih živali ni zakona, ki bi celovito urejal področje, zato sem proučila tiste, ki se z njim vsebinsko prepletajo, vključno s podrejenimi akti, in sicer:

- Zakon o ohranjanju narave (ZON) iz l. 1999 ureja varstvo prostoživečih živalskih vrst, vključno z njihovim genskim materialom in habitatom ter ekosistemi, in omogoča njihovo trajnostno rabo. V njem so opredeljeni, med drugim, tudi pojmi: prostoživeče živalske vrste, gojene živali, gojitev.
- Zakon o divjadi in lovstvu (ZDLov-1) iz l. 2004 ureja upravljanje z divjadjo ter določa katere prostoživeče živali so divjad.
- Zakon o živinoreji (Zživ) iz l. 2002 določa, med drugim, cilje živinoreje, pogoje in način reje ter nemoteno rejo, ureja načine živinoreje, rejske programe, spreminjanje in ohranjanje lastnosti domačih živali, prenos selekcijskih dosežkov v rejo, ohranjanje genetske variabilnosti, genetske rezerve in avtohtone pasme, genske banke v živinoreji ter izobraževalno in raziskovalno delo na področju živinoreje. Določbe tega zakona se nanašajo na rejo kopitarjev, govedi, prašičev, ovc, koz, kuncev, perutnine, rib in čebel kot tudi za prostoživeče živali, ki se gojijo v skladu s predpisi, ki urejajo ohranjanje narave.
- Z veterinarske stroke sta s področjem povezana Zakon o veterinarstvu (Zvet-1) iz l. 2001 in Zakon o veterinarskih merilih skladnosti (ZVMS) iz l. 2005.
- Zakon o zaščiti živali (ZZŽiv) iz l. 1999 določa pravila za ustrezno ravnanje z živalmi. Dosledno se izvaja pri vretenčarjih, pri drugih živalih pa glede na stopnjo njihove občutljivosti v skladu z ustaljenimi izkušnjami ter znanstvenimi dognanji.

Obravnavani zakoni in njihovi podzakonski akti so navedeni med viri.

Pri delu je bila zlasti uporabljena dogmatična metoda, katere najpomembnejša orodja so jezik, logika in pravni sistem. Uporabila sem logično proučevanje, ki zajema uporabo logičnih postavk o naravi in vrsti pojmov, sklepanj, o oblikovanju opredelitev, deduktivnem in induktivnem sklepanju, analizi, sintezi itn.

S končno sintezo ugotovitev sem oblikovala predlog razdelitve in rabe proučevanih terminov ter podala predlog osnovnih sprememb omenjenih predpisov.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Domače živali – prostoživeče živalske vrste

Davis (1987, cit. po About Domestication. 2006) definira domače živali (ang. domestic animal) kot tiste, katerih razmnoževanje v veliki meri kontrolira človek. Evolucija udomačenih vrst je v glavnem rezultat umetne izbire, pri kateri je naravna selekcija imela stransko vlogo. Proces udomačitve (domestifikacije) povzroča ločitev, delno ali popolno, odbranega staleža od njegovih neudomačenih prednikov. Domače živali je človek odbiral skozi več tisoč let, pri čemer je upošteval zaželene lastnosti; nekatere od njih so fizične (npr. količina in razporejenost mesa, velikost, sprememba oblike, dlakavost, operjenost), druge vedenjske (krotkost, ubogljivost). Skoraj brez izjeme domače živali izvirajo iz vrst, ki so zelo socialne.

V naši zakonodaji sta opredeljena tako pojem domačih živali kot prostoživečih vrst živali.

V Zakonu o živinoreji je zapisano, da so domače živali tiste, ki jih človek redi za svojo korist in živijo pod njegovim varstvom ter oskrbo in niso prostoživeče živali po predpisih o ohranjanju narave. Definicija ne vključuje domestikacije, ampak temelji na ravnanju z živalmi. Pomanjkljivost te definicije je, da pojem določa tudi z opredeljevanjem tistega, kar ta pojem ni. Le-to bom ponazorila z nekoliko nenavadnim, čeprav ne neverjetnim primerom. Po Zakonu o ohranjanju narave so prostoživeče vrste tiste, katere osebk – vse razvojne oblike (v nadaljnjem besedilu: živali) lahko živijo prosto v naravi, neodvisno od človeka in niso nastale z umetnim izborom (odbiranje in gojenje osebkov z namenom pridobivanja pasem domačih živali) ali biotehnološkim poseganjem v dedne zasnove. Če bi v Sloveniji z biotehnološkim posegom v dedno zasnovo ustvarili gensko spremenjene osebk divjega prašiča, z namenom nadaljne reje takih živali, potem le-ti ne bi bili prostoživeča vrsta po določitvi Zakona o ohranjanju narave. Živali bi redili za svojo korist in bi živele pod našo oskrbo v skladu z Zakonom o živinoreji. Torej to ne bi bile prostoživeče živali po predpisih o ohranjanju narave, temveč bi jih na podlagi ZŽiv lahko uvrstili med domače živali.

Prostoživeče živalske vrste – divjad

Zakon o divjadi in lovstvu določa, katere prostoživeče živalske vrste sodijo med divjad. Divjad so po tem zakonu vrste prostoživečih sesalcev in ptic, ki jih lovimo. Na podlagi njegovega 38. člena je Vlada RS izdala Uredbo o določitvi divjadi in lovni dob, v kateri so določene vrste prostoživečih sesalcev in ptic, ki so divjad. Pojem divjad je torej podmnožica pojma prostoživeče živalske vrste.

Opozorila bom, da Zakon o veterinarstvu iz leta 2001 pojem divjad uporablja v ožjem pomenu – divjad so divje živali*, določene s predpisi o lovstvu, katerih meso je uporabno za prehrano ljudi in se jih ne kolje kot domače živali, temveč lovi, v skladu s predpisi o lovstvu. Za divjad štejejo tudi divji sesalci in ptice, ki prosto živijo na zaprtem območju, podobno kot prostoživeča divjad in se jih lovi v skladu s predpisi o lovstvu. Zakon torej obravnava samo tisto divjad, katere meso je uporabno za prehrano ljudi.

* oz. prostoživeče vrste, kajti prejšnji zakon o divjadi in lovstvu, ki je bil takrat v veljavi, za prostoživeče vrste uporablja izraz prostoživeče divje živali in verjetno od tam izvira raba izraza divje živali

Prostoživeče živali v ujetništvu – gojene prostoživeče živali

Zakon o ohranjanju narave ureja varstvo prostoživečih živalskih vrst, vključno z njihovim genskim materialom in habitatu ter ekosistemi, in omogoča trajnostno rabo sestavin biotske raznovrstnosti. Gojitev živali prostoživečih vrst je po tem zakonu gojenje (hranjenje, omogočanje razmnoževanja, križanje) živali domorodnih ali tujerodnih vrst v prostoru, ločenem od narave (ograde, obore, kletke, bazeni, korita in podobo), zlasti z namenom pridobivanja hrane, lova, prodaje, učno-vzgojnega ali znanstvenoraziskovalnega dela ter zaradi ohranitve vrste. Pojem gojena žival pa ni izpeljan neposredno iz opredelitve gojenja živali. Gojene živali bi bile torej tiste, ki jih gojimo (v takem primeru bi bili tudi tisti osebk, ki so bili živi odvzeti iz narave in bi jih hranili, jim omogočali razmnoževanje, itn. - gojene živali). Zakon pa določa, da je gojena žival* tista, ki je potomka staršev vzrejenih v ujetništvu.

Pojma živali v ujetništvu ZON ne določa. Ali so vse živali, ki se nahajajo v prostorih, ločenih od narave, živali v ujetništvu in so potem gojene živali podmnžica tega pojma? Bolj logična je drugačna izpeljava.

Predstavljam si, da so bile živali prostoživeče vrste žive odvzete iz narave (ujete) in so od takrat začasno ali za stalno v ujetništvu (lahko jih označimo za parentalno generacijo - P). Te živali v ujetništvu lahko oskrbujemo in v ujetništvu imajo potomce (1. filialna generacija - F1). Po določitvi Zakona so šele potomci teh živali gojene živali (torej F2 - generacija). Kaj pa so potomci gojenih živali? Sklepam, da so tudi ti osebk gojene živali, čeprav to ni nikjer določeno in bi to mogoče bilo smiselno zapisati v definicijo pojma gojena žival.

Na podlagi opredelitve pojma gojena žival oz. žival, ki je potomka staršev vzgojenih v ujetništvu, izpeljujemo, da so živali v ujetništvu tiste, ki so bile žive odvzete iz njihovega naravnega okolja in prva generacija njihovih potomcev. Iz napisanega torej sledi, da so po ZON samo živali P- in F1-generacij živali v ujetništvu.

Zastavlja se vprašanje, zakaj je med živali v ujetništvu vključena tudi F1.

Kot živali v ujetništvu bi lahko opredelili samo živali prostoživečih vrst, ki so bile iz različnih razlogov za določen ali nedoločen čas žive odvzete iz svojega naravnega okolja, vse druge živali prostoživečih vrst, ki živijo v prostoru ločenem od narave in pod oskrbo človeka, pa kot gojene živali.

Prostoživeče živali - gojene prostoživeče živali – gojena divjad

Pojem divjad zajema podmnžico prostoživečih živali. Enak odnos je med pojmom gojena divjad in gojene prostoživeče živalske vrste. Kako pa je to upoštevano v naših predpisih?

Gojitev živali prostoživečih vrst je po ZON gojenje (hranjenje, omogočanje razmnoževanja, križanje) živali domorodnih ali tujerodnih vrst v prostoru, ločenem od narave (v ogradi, obori, kletki, ...)[†].

Zakon o divjadi in lovstvu, ki obravnava samo tiste prostoživeče vrste sesalcev in ptic, ki so določene za divjad, v svojem 5. členu opredeljuje vzrejo ali rejo[‡] divjadi kot gojitev divjadi po predpisih s področja ohranjanja narave. Torej je gojitev divjadi gojenje (hranjenje, omogočanje razmnoževanja, križanje) živali domorodnih[§] ali tujerodnih vrst v prostoru, ločenem od narave (v ogradi, obori, kletki, ...). Glede na to, da je pojem gojena divjad podmnžica pojma gojene

* gojena žival = gojen osebek prostoživeče vrste živali, ker zakon obravnava samo prostoživeče vrste

[†] V primeru živali v ujetništvu, bi lahko razmislili o uporabi termina oskrbovanje namesto gojenja – živali v ujetništvu oskrbujemo in ne gojimo.

[‡] V Zvet-1 sta to dva pojma. Reja je opredeljena kot dejavnost reprodukcije živali s poudarkom na količinskih vidikih, vzreja pa kot načrtna dejavnost reprodukcije živali in skrbi zanje, za doseganje kakovostno opredeljenih lastnosti potomstva.

[§] ZDLov-1, ki je specialen zakon, določa da v oborah ni dovoljeno zadrževati domorodnih vrst divjadi

prostoživeče vrste, bi jo po ZON morali razumeti kot tisto divjad, ki je potomka staršev vzgojenih v ujetništvu, divjad v ujetništvu pa žival P- oz. F1-generacije. Zakon o divjadi in lovstvu pa ne vsebuje termina gojena divjad temveč razvršča živali, ki se nahajajo v prostoru, ločenem od narave v dve skupini – divjad v ujetništvu in divjad v oborah. Divjad v ujetništvu so po tem zakonu posamezni osebki ali skupine osebkov divjadi, zaprti v kletkah, voljerah ali na ograjenih površinah manjših od 0,5 ha.

Pri divjadi v oborah pa zakon določa tri vrste obor:

1. za rejo divjadi – površine od 0,5 ha do 30 ha;
2. obore s posebnim namenom – površine do 30 ha in
3. lovne obore – površine nad 200 ha.

Po določilih Zakona o ohranjanju narave lahko obe kategoriji živali dojemamo kot gojeno divjad (pod pogojem, da ne gre za P- oz. F1-generacijo). Predvsem je sporna opredelitev termina divjad v ujetništvu, ki je vsebinsko nezdružljiva z ZON. Zamislimo si osebke muflona, ki bi bili potomci staršev, vzgojenih v ujetništvu in bi se jih gojilo v smislu ZON na manj kot 0,5 ha površine. Po določilih ZON bi to bile gojene živali, po določilih ZDLov-1 pa živali v ujetništvu. Torej so določila teh dveh zakonov glede gojene divjadi in divjadi v ujetništvu neprimerljiva in celo nasprotujoča*.

V slovenski zakonodaji področje gojenja divjadi delno ureja tudi Zakon o veterinarstvu. Že prej sem omenila, da je v Zvet-1 pojem divjadi omejen na tisto divjad, katere meso se uporablja za prehrano ljudi. Isti zakon opredeljuje tudi pojem gojene divjadi, pri kateri je sporno to, da se kljub sklicevanju na predpise o divjadi in lovstvu, pri opredelitvi termina divjad, med gojeno divjad uvrščajo tudi plazilci, kar je nelogično glede na to, da je pojem gojena divjad podmnožica pojma divjad. Poudarjam, da tudi podpojem divjadi – gojena divjad – po Zvet-1 obsega samo tisto gojeno divjad, katere meso se uporablja v ljudski prehrani.

V Pravilniku o pogojih za zakol živali izven klavnice za lastno domačo porabo, katerega podlaga je Zakon o veterinarstvu, so plazilci izpušeni iz definicije gojene divjadi. Pravilnik uporablja termin velika gojena divjad[†], ki ga ne zasledimo v zakonodaji o divjadi in lovstvu, med katere uvršča parkljasto divjad[‡] in noje[§]. Uvrstitev nojev v to kategorijo je v nasprotju z Zakonom o divjadi in lovstvu oz. z Uredbo Vlade RS o določitvi divjadi in lovnih dobah. Dejstvo je, da noje lahko gojimo, ne moremo pa govoriti o gojeni divjadi, temveč o gojenih živalih tujerodne prostoživeče vrste, skladno z Zakonom o ohranjanju narave. Zakon o živinoreji pa določa, da lahko minister, pristojen za živinorejo, skladno z zakonom, ki ureja ohranjanje narave, predpiše pogoje za rejo prostoživečih živali (torej vseh prostoživečih živali in ne samo divjadi).

V Pravilniku o zaščiti živali pri zakolu in v pravilniku o njegovi spremembi so določila o ravnanju z veliko gojeno divjadjo, ampak tega termina ne definira, tako kot ga ne definirata Zvet-1 in ZDLov-1.

Pojem gojena divjad zasledimo tudi v Pravilniku o izvajanju rednih uradnih veterinarskih pregledov na gospodarstvih, katerega podlaga je Zakon o veterinarskih merilih skladnosti, čeprav v njem ni definicije tega pojma, tako kot ga ni v omenjenem zakonu. Ali potem pojem razumemo kot gojeno divjad po Zakonu o ohranjanju narave in Zakonu o divjadi in lovstvu, ali kot gojeno divjad po Zakonu o veterinarstvu, ki zajema tudi sporne plazilce?

* V primeru izbora druge prostoživeče vrste, ki ni opredeljena kot divjad, omenjene neusklajenosti med zakonoma ne bi bilo, ker področje ureja samo ZON.

[†] V Pravilniku o pogojih za zbiranje uplenjene divjadi, veterinarski pregled, proizvodnjo mesa in oddajo mesa uplenjene divjadi v promet se omenja termin velika divjad, ki zajema parkljasto divjad in medveda.

[‡] parkljasto gojeno divjad

[§] Podobno opredelitev terminov zasledimo tudi v Pravilniku o pogojih za proizvodnjo in predelavo živil živalskega izvora na kmetiji za neposredno prodajo končnemu potrošniku.

Zakon o veterinarskih merilih skladnosti uporablja termin, ki bo v veliko pomoč pri poznejšem predlogu razpleta terminološke zmede, s katero se srečujemo na področju gojenja vrst prostoživečih živali, in sicer rejne živali*. Rejne živali so živali, ki se vzrejajo ali redijo za proizvodnjo hrane oziroma za proizvodnjo volne, kože, krzna ali v druge gospodarske namene.

V predpisih s področja veterinarstva bomo še zasledili, da gojeno divjad delijo na tisto, ki prosto živi na zaprtem območju, podobno kot prostoživeča divjad† ter tisto, ki se jo redi kot domače živali. Zelo težko je opredeliti pomen slednjega. Ali divjad v oborah za rejo divjadi gojimo kot domače živali? Kje je tista meja, ki bo pri gojenju divjadi določila, da jo redimo kot domačo žival (pri tem moramo upoštevati, da ZDLov-1 predvideva velikost obor za rejo živali od 0,5 do 30 ha)? Kakšna naj bi bila obtežitev površine z živalmi? Menim, da je primerjava z rejo domačih živali neprimerna, ker že Pravilnik o minimalnih pogojih za zaščito rejnih živali ... govori, da je treba upoštevati stopnjo udomačenosti vrste ter njene fiziološke in etološke posebnosti. Isti pravilnik predpisuje minimalne pogoje za zaščito rejnih živali, ki so enaki tako za domačega prašiča kot za divjega, ker predpis velja za živali vrste *Sus scrofa*. Ob tem poudarjam, da ZDLov-1 določa, da v oborah za rejo divjadi ni dovoljeno zadrževati domorodnih vrst divjadi. Torej divjih prašičev ne moremo rediti v oborah za rejo divjadi po določenih omenjenega zakona, lahko pa jih gojimo na površini do 0,5 ha, skladno s prej omenjenim določilom Zakona o živinoreji. Očitno se postavlja vprašanje ločevanja med oborami za rejo divjadi po določenih ZDLov-1 in oborami za rejo živali po določenih Zživ.

Na podlagi 24. člena Zakona o ohranjanju narave‡ je Vlada RS izdala Uredbo o ravnanjih in načinih varstva pri trgovini z živalskimi in rastlinskimi vrstami. Na podlagi naslova uredbe težko sklepamo, da le-ta določa tudi pogoje za dejavnost gojenja osebkov prostoživečih živalskih vrst. Poglavje o gojenju ali umetnem razmnoževanju osebkov vrst obsega samo dva člena ki sta, kljub temu, da predstavljata korak k ureditvi problematike gojenja in reje prostoživečih živalskih vrst, nezadostna za kakršno koli resno urejenost področja. Žal določili tudi nista vsebinsko usklajeni z ostalimi predpisi (ZDLov-1, Zvet-1, ZVMS ter Zživ), tako si zelo težko predstavljam, da bi upravljalca lovne obore, ki meri čez 200 ha, osebe živali matične skupine označeval ali celo strokovnemu organu predložil podatke o starosti in razpoznavnih znakih (številke oznak) vsakega samca in samice.

Iz napisanega sledi, da bo za urejanje tako zahtevnega področja, kot je gojenje oz. reja prostoživečih živali potrebno izdelati predpis, ki bo to področje celovito urejal. Kot osnovna težava se ponovno izkaže neusklajena in nedodelana terminologija, ki je osnova za ustrezno delitev pristojnosti in usklajevanje resorjev.

Predlog za razdelitev in rabo terminov

Osnova pravne urejenosti določenega področja so jasno opredeljeni termini ter usklajenost predpisov. Pri nastajanju predpisov predlagam naslednjo razdelitev in rabo terminov znotraj termina živali:

1. DOMAČE ŽIVALI – ang. domestic animals

1.a domače živali v reji za pridobivanje hrane ali za druge gospodarske namene

* Termin rejne živali zasledimo tudi v Zakonu o veterinarstvu, kjer ima enak pomen.

† Npr. v lovni obori, ki so velike najmanj 200 ha in so razglašene za gozd s posebnim namenom. V njih se po ZDivL, za razliko od drugih dveh tipov obor, ki so izločene iz lovni površin, načrtuje upravljanje z divjadjo. Zakon o veterinarstvu divjad v teh oborah šteje za prostoživečo divjad.

‡ V 24. členu ZON je zapisano, da Vlada uredi ravnanje v zvezi z odvzemom živali iz narave, gojenjem, prenašanjem, naseljevanjem, ponovnim naseljevanjem in doseljevanjem, zadrževanjem živali v ujetništvu, trgovino, raziskovanjem živali, ravnanjem z mrtvimi živalmi ter preparatorstvom.

1.b domače živali, ki jih gojimo za družbo^{*}, rekreacijo, varstvo ali pomoč človeku, v izobraževalne ali znanstvene namene in dr.

1.c domače živali, ki živijo neodvisno od človeka – potepuške domače živali

2. PROSTOŽIVEČE VRSTE ŽIVALI

2.a) divjad

2.a.1 živali v naravnem okolju

2.a.2 živali v ujetništvu

2.a.3 živali, ki jih redimo za pridobivanje hrane ali za druge gospodarske namene – ang. game farm animals – (npr. divjad v oborah za rejo divjadi; lov v lovnih oborah) ter

2.a.4 živali, ki jih gojimo za družbo, rekreacijo, varstvo ali pomoč človeku, v izobraževalne ali znanstvene namene in dr.

2.b) druge prostoživeče vrste

2.b.1 živali v naravnem okolju

2.b.2 živali v ujetništvu

2.b.3 živali, ki jih redimo za pridobivanje hrane ali za druge gospodarske namene – (npr. noji) ter

2.b.4 živali, ki jih gojimo za družbo[†], rekreacijo, varstvo ali pomoč človeku, v izobraževalne ali znanstvene namene in dr.

Pri obeh osnovnih kategorijah moramo predvideti možnost nastajanja gensko spremenjenih osebkov, kar ne vpliva na osnovno delitev in zahteva samo dodatno oznako, da gre za gensko spremenjen organizem.

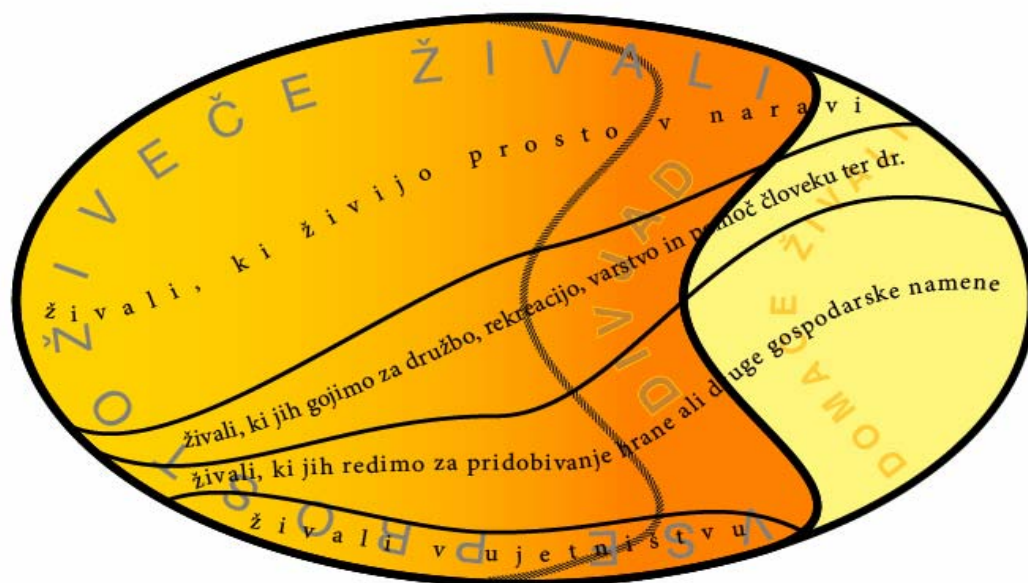
V predpisih EU izraz »domestic animal« ni opredeljen. V večjezični terminološki bazi izrazov Evropske unije sta oba izraza: domestic animal in farm animal v slovenščino prevedena enako – domača žival.

Izraz farm animals je v Globalni strategiji upravljanja z živalskimi genskimi viri uporabljen za tiste živalske vrste, ki se uporabljajo ali bi se lahko uporabljale za pridelavo hrane in v kmetijstvu ter njihove populacije in pomensko ustreza pojmu rejne živali, ki je opredeljen v Zakonu o veterinarstvu in Zakonu o veterinarskih merilih skladnosti.

Glede na to, da pojmov rejna oz. hišna žival ne moremo povezovati samo z domačimi ali samo s prostoživečimi živalmi, predlagam, da bi se pri načrtovanju novih predpisov upoštevala predlagana razdelitev. Na podlagi le-te bi rejne živali pomenile tako domače živali kot prostoživeče vrste (torej tudi divjad), ki jih redimo za prirejo hrane ali druge gospodarske namene. Za izraz rejna žival, ki ga poznamo iz Zvet-1 in ZVMS, pri prevajanju izraza "farm animal" nekateri strokovnjaki, tako s področja biotehnike kot jezikoslovja, menijo, da ni primeren. Mogoče bi lahko uporabljali neposreden prevod – kmetijske živali (kot vzporednica izrazu kmetijske rastline) – čeprav bi tudi ta verjetno zbujal deljena mnenja. Prav tako predlagam, da bi za oskrbo živali, ki so namenjene pridobivanju hrane ali druge gospodarske namene uporabljali izraz reja, za vse druge namene (družba, rekreacija, ...) pa gojenje.

^{*} V slovenski zakonodaji (Zvet-1 in ZZZiv) je opredeljen pojem hišne živali, in sicer kot: psi, domače mačke, domače ptice, mali glodalci, terarijske, akvarijske in druge živali, ki se vzrejajo ali redijo za družbo, rekreacijo, varstvo ali pomoč človeku. Sam pojem je nekoliko vprašljiv, ker v številnih primerih te živali ne živijo v hiši.

[†] Odredba o bivalnih razmerah in oskrbi živali prostoživečih vrst v ujetništvu uporablja izraz hišne živali prostoživečih vrst.



Slika 1. Shematski prikaz vsebinskih razlik med predlaganimi kategorijami znotraj termina živali.

Figure 1. The schematic representation of essential differences between proposed terms.

Slika 1 prikazuje vsebinske razlike med predlaganimi kategorijami znotraj termina živali ter njihov medsebojni odnos. Razmerja med površinami zaradi enostavnejšega prikaza le v grobem ponazarjajo kvantitativne odnose med posameznimi kategorijami živali.

Predlog osnovnih sprememb predpisov

Na podlagi predlagane rabe terminov priporočam nekaj osnovnih sprememb v predpisih, ki urejajo področje gojenih prostoživečih živali oz. prostoživečih živali v reji.

Zakon o ohranjanju narave

V Zakon o ohranjanju narave bi bilo potrebno vključiti definicijo živali v ujetništvu, ki bi na podlagi prej napisanega bila:

Živali v ujetništvu so živali prostoživečih vrst, ki so za določen ali nedoločen čas odvzete žive iz svojega naravnega okolja ter njihovi prvi potomci, ki so vzrejeni v prostoru ločenem od narave*.

Gojitev živali prostoživečih vrst je gojenje (hranjenje, omogočanje razmnoževanja, križanje) živali domorodnih ali tujerodnih vrst na prostoru, ločenem od narave (v ogradi, obori, kletki, bazenih, koritih in v podobnih prostorih), zlasti z namenom lova, prodaje, učno-vzgojnega ali znanstvenoraziskovalnega dela ter zaradi ohranitve vrste†.

Gojene živali so potomci živali vzgojenih v ujetništvu ter njihovi potomci, ki jih gojijo v prostoru, ločenem od narave.

Reja živali prostoživečih vrst je oskrba (hranjenje, omogočanje razmnoževanja, križanje) živali domorodnih ali tujerodnih vrst v prostoru, ločenem od narave (v ogradi, obori, kletki, v bazenih, koritih in v podobnih prostorih) z namenom pridobivanja hrane.

* Namena odvzema ni potrebno opredeliti!

† Iz prvotne definicije je izpuščeno: gojenje živali z namenom pridobivanja hrane.

Rejne živali prostoživečih vrst so živali teh vrst v reji.

V primeru, da v razpravi omenjene F1 generacije ne bi uvrstili med živali v ujetništvu bi temu ustrezno prilagodili predlagane definicije.

Zakon o divjadi in lovstvu

V zakon bi bilo potrebno vključiti definicijo divjadi v ujetništvu ter druge definicije skladne z ZON, in sicer:

Divjad v ujetništvu so živali prostoživečih vrst opredeljene kot divjad po tem zakonu, ki so za določen ali nedoločen čas odvzete žive iz svojega naravnega okolja ter njihovi prvi potomci, ki so vzrejeni v prostoru, ločenem od narave.

Gojitev divjadi je gojenje (hranjenje, omogočanje razmnoževanja, križanje) živali domorodnih ali tujerodnih vrst divjadi v prostoru, ločenem od narave (v ogradi, obori, kletki, v bazenih, koritih in v podobnih prostorih), zlasti z namenom lova, prodaje, učno-vzgojnega ali znanstvenoraziskovalnega dela ter zaradi ohranitve vrste.

Gojena divjad so potomci živali, vzgojene v ujetništvu ter njihovi potomci, ki jih gojimo v prostoru, ločenem od narave.

Reja divjadi je oskrba (hranjenje, omogočanje razmnoževanja, križanje) živali domorodnih ali tujerodnih vrst v prostoru, ločenem od narave (ogradi, obori, kletki, bazenih, koritih in v podobnih prostorih) z namenom pridobivanja hrane.

Rejna divjad so živali divjadi v reji.

Tako kot pri predlogih za spremembo Zakona o ohranjanju narave bi bilo treba, v primeru, da F1 generacije ne uvrstimo med živali v ujetništvu, ustrezno prilagoditi predlagane definicije.

Spremeniti je potrebno tudi poglavje in člene, ki podrobneje urejajo področje divjadi v ujetništvu in divjadi v oborah. Obore za rejo divjadi bi lahko merile od 0–30 ha, obore s posebnim namenom enako. Divjad iz slednjih bi opredelili kot gojeno divjad, ker namen gojenja ni pridobivanje hrane.

Pri določilih o divjadi v lovni oborah bi bilo potrebno uskladiti tri zakone: ZON, ZDLov-1 ter Zvet-1. Potrebno bi se bilo odločiti ali bo divjad iz lovni obor (le-te imajo status gozda s posebnim namenom in merijo nad 200 ha ter se v njih načrtuje upravljanje z divjadjo podobno kot za divjad, ki živi prosto v naravi) imela status gojene divjadi (skladno z ZON in ZDLov-1) ali pa se bo njen status izenačil s prostoživečo divjadjo (skladno z Zvet-1).

Zakon o veterinarstvu

Definicijo divjadi bi morali uskladiti z ZDLov-1. Kot sem opozorila v prejšnjem poglavju, bi bilo potrebno uskladiti status divjadi, ki prosto živi na zaprtem območju, podobno kot prostoživeča divjad, z določili ZON in ZDLov-1.

Definicije gojenih prostoživečih živali in prostoživečih živali v reji oz. gojene divjadi in divjadi v reji bi bilo potrebno povzeti iz predlagane rešitve za ZON oz. ZDLov-1.

Potrebno bi bilo opredeliti pogoje reje živali prostoživečih vrst in divjadi, ki bodo upoštevali posebnosti posameznih vrst ter pogoje, ki vplivajo na načina njihove usmrtnitve.

Iz Pravilnika o pogojih za zakol živali izven klavnice za lastno domačo porabo bi bilo treba izločiti definicijo velike gojene divjadi ter urediti, da določila veljajo za parkljasto divjad v reji. Sporno uvrstitev nojev v gojeno divjad bi bilo potrebno spremeniti oz. bi jih morali obravnavati ločeno, in sicer kot živali prostoživeče vrste v reji.

Pri oblikovanih predlogih sem predstavila samo potrebo po osnovnih spremembah predpisov, ki urejajo področje gojenja oz. reje prostoživečih živali. Pri vseh predpisih, ki urejajo področje prostoživečih, gojenih ali rejnih živali predlagam dosledno uporabo predstavljene terminologije in temu primerne spremembe posameznih členov. Vsekakor bi vsi ti predpisi, v primeru usklajevanja terminologije, morali iti skozi temeljito analizo.

SKLEPI

- Predpisi R Slovenije, ki urejajo ravnanje z gojenimi in rejnimi živalmi, predvsem prostoživečih vrst, ne uporabljajo medsebojno usklajenih terminov.
- Potrebno je uskladiti in doreči zlasti izraze: živali (divjad) v ujetništvu, gojene živali (gojena divjad), rejne živali oz. živali (divjad) v reji, pri čem je bistvenega pomena opredeliti namen ravnanja z njimi, ker je od le tega odvisen njihov pravni status.
- Za oskrbo živali, ki so namenjene pridobivanju hrane ali druge gospodarske namene bi lahko uporabljali izraz reja, za oskrbo v druge namene (družba, rekreacija, ...) pa gojenje.
- Pri vseh predpisih, ki urejajo področje prostoživečih, gojenih ali rejnih živali predlagam dosledno uporabo usklajene terminologije in temu primerne spremembe posameznih členov. Vsi predpisi bi v primeru usklajevanja, morali iti skozi temeljito analizo.
- Dodelava in usklajevanje terminologije je proces, ki zahteva sodelovanje različnih strok in je, če je dobro opravljena, osnova za pravno urejenost področja. Oblikovani predlogi bodo mogoče korak v to smer.

VIRI

- About Domestication. <http://www.isleauhaut.net/maskd/index.htm> (26. maj 2006).
- Odredba o bivalnih razmerah in oskrbi živali prostoživečih vrst v ujetništvu. Ur. l. RS, št. 90/2001.
- Pravilnik o zaščiti živali pri zakolu. Ur. l. RS, št. 33/2005, 5/2006.
- Pravilnik o veterinarsko-sanitarnih pogojih za proizvodnjo živil živalskega izvora ter oddajo v promet za javno potrošnjo. Ur. l. RS, št. 91/1999, 38/2000, 81/2002, 100/2002.
- Pravilnik o veterinarskih pogojih za proizvodnjo in oddajo v promet živil živalskega izvora. Ur. l. št. 100/2002.
- Pravilnik o pogojih za zbiranje uplenjene divjadi, veterinarski pregled, proizvodnjo mesa in oddajo mesa uplenjene divjadi v promet. Ur. l. RS, št. 81/2002.
- Pravilnik o pogojih za zakol živali izven klavnice za lastno domačo porabo. Ur. l. RS, št. 117/2004.
- Pravilnik o pogojih za proizvodnjo in predelavo živil živalskega izvora na kmetiji za neposredno prodajo končnemu potrošniku. Ur. l. RS, št. 117/2004 (126/2004 – popr.).
- Pravilnik o označevanju živali prosto živečih vrst v ujetništvu. Ur. l. RS, št. 58/2004.
- Pravilnik o minimalnih pogojih za zaščito rejnih živali in postopku registracije hlevov za rejo kokoši nesnic. Ur. l. RS, št. 41/2003, 117/2004.
- Pravilnik o izvajanju rednih uradnih veterinarskih pregledov na gospodarstvih. Ur. l. RS, št. 23/2006.
- Slovar izrazov Evropske unije. <http://www.gov.si/evroterm/> (10. apr. 2003).
- The Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources: Executive Brief. Rome, Food and Agriculture Organization: 41. <http://dad.fao.org/en/refer/library/idad/ex-brf.pdf> (26. maj 2006).
- Uredba o živalskem vrtu in živalskem vrtu podobnem prostoru. Ur. l. RS, št. 37/2003.
- Uredba o zatočišču za živali prosto živečih vrst. Ur. l. RS, št. 98/2002, 46/2004.
- Uredba o ravnanjih in načinih varstva pri trgovini z živalskimi in rastlinskimi vrstami. Ur. l. RS, št. 52/2004.
- Uredba o določitvi divjadi in lovnih dob. Ur. l. RS, št. 101/2004.
- Zakon o živinoreji /Zživ/Ur. l. RS, št. 18/2002, 110/2002-ZUreP-1 (8/2003 – popr.), 110/2002-ZGO-1, 45/2004).
- Zakon o zaščiti živali /ZZZiv/Ur. l. RS, št. 98/1999, 126/2003.
- Zakon o zaščiti živali (uradno prečiščeno besedilo) /ZZZiv-UPB1/Ur. l. RS, št. 20/2004.
- Zakon o veterinarstvu /Zvet-1/Ur. l. RS, št. 33/2001.
- Zakon o veterinarskih merilih skladnosti /ZVMS/Ur. l. RS, št. 93/2005.
- Zakon o ohranjanju narave /ZON/Ur. l. RS, št. 56/1999 (31/2000 – popr.), 110/2002-ZGO-1, 119/2002, 41/2004.
- Zakon o ohranjanju narave (uradno prečiščeno besedilo) /ZON-UPB2/Ur. l. RS, št. 96/2004.
- Zakon o divjadi in lovstvu /ZDLov-1/Ur. l. RS, št. 16/2004.
- Žigo Jonozovič, A. Ohranjanje biotske raznovrstnosti v slovenskem kmetijstvu v luči mednarodne pravne ureditve. Magistrska naloga. Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., 2004, 113 str.

EXAMINATION OF AI-2 QUORUM SENSING SYSTEM IN *Prevotella bryantii* AND *Prevotella ruminicola*-LIKE STRAINS BY USING BIOLUMINESCENCE ASSAY

Gregor GORENC^{a)}, Filip LUKÁŠ^{b)} and Gorazd AVGUŠTIN^{c)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Zootechnical Dept., Chair for Microbiology and Microbial Biotechnology, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia.

^{b)} Academy of Science of the Czech Republic, Institute of Animal Physiology and Genetics, Vídeňská 1083, 142 20 Prague, Czech Republic.

^{c)} Same address as ^{a)}, e-mail: gorazd.avgustin@bfro.uni-lj.si.

Received November 12, 2007, accepted December 03, 2007.

Delo je prispelo 12. novembra 2007, sprejeto 03. decembra 2007.

ABSTRACT

Rumen is an example of a complex microbial ecosystem where extensive intraspecies as well as interspecies cell-cell cross-communication is expected, but little is known about. Four ruminal *Prevotella* strains, *Prevotella bryantii* B₁₄, TC1-1 and TF1-3, and *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A were examined for the presence of AI-2 type quorum sensing systems. *Vibrio harveyi* BB170 autoinducer bioassay was used in order to detect the production of AI-2 autoinducer in examined strains. Optimization of autoinducer bioassay was made to test the influence of sampling time and the substrate used in chemically defined medium CD on reporter strain luminescence signal. We discovered that AI-2 type quorum sensing system is present in *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A, which induced more than 74% of reporter strain bioluminescence, regardless of the presence of glucose in chemically defined medium CD. Such induction of bioluminescence was not observed in *P. bryantii* strains, however.

Key words: microbiology / rumen / *Prevotella* / quorum sensing / bioassay / *V. harveyi* BB170

UGOTAVLJANJE SISTEMA ZA ZAZNAVANJE KRITIČNE CELIČNE GOSTOTE AI-2 PRI BAKTERIJI *Prevotella bryantii* IN SEVIH, KI SO PODOBNI BAKTERIJI *Prevotella ruminicola*, S TESTOM BIOLUMINESCENCE

IZVLEČEK

Vamp prežvekovalcev predstavlja kompleksen mikrobni ekosistem, kjer pričakujemo obsežne tako znotrajvrstne kot tudi medvrstne medcelične komunikacije, vendar je o njih le malo znanega. Pri štirih vampnih sevih iz rodu *Prevotella*, t.j. *Prevotella bryantii* B₁₄, TC1-1 in TF1-3 ter *P. ruminicola*-podobnem sevu 223/M2/7A smo preverili prisotnost sistemov za zaznavanje celične gostote tipa AI-2. Z uporabo biološkega testiranja avtoinduktorjev s testnim organizmom *Vibrio harveyi* BB170 smo ugotavljali produkcijo molekul AI-2 pri preučevanih mikroorganizmih. S preverjanjem vpliva časa biološkega testiranja ter substrata, uporabljenega v kemijsko definiranem gojišču CD, na signal bioluminescence reporterskega seva, smo optimizirali biološko testiranje avtoinduktorskih molekul. Ugotovili smo, da je AI-2 tip sistema za medcelično komunikacijo prisoten pri *P. ruminicola* podobnem sevu 223/M2/7A, ki je induciral več kot 74 % bioluminescence reporterskega seva, ne glede na prisotnost glukoze v kemijsko definiranem gojišču CD. Indukcije bioluminescence pri sevih vrste *P. bryantii* nismo opazili.

Ključne besede: mikrobiologija / vamp / *Prevotella* / zaznavanje celične gostote / biološko testiranje / *V. harveyi* BB170

INTRODUCTION

Rumen is a complex ecosystem with mixed microbial community of high density and complexity, a semi-closed environment with many possible symbiotic and pathogenic conditions, where extensive possibilities, systems and routes of intraspecies as well as interspecies cell-cell communication could be found (Mitsumori *et al.*, 2003). Many bacteria use autoinducer molecules to monitor their population density, and regulate their gene expression and population behavior accordingly, a system termed quorum sensing. The first discovered type of quorum sensing system, AI-1, used by Gram-negative proteobacteria, employs acylated homoserine lactones for intra-species communication (Miller and Bassler, 2001). Recently it was reported that AI-1 was also present in rumen contents, but surprisingly, not in any of the cultured rumen bacteria (Erickson *et al.*, 2002). The second type of quorum sensing system, AI-2, is the most widely found quorum sensing system, used for inter-species communication. It employs short peptides, produced by LuxS homolog (Surette *et al.*, 1999; Bassler and Losick, 2006). The presence of AI-2 in rumen was also detected. Possible quorum sensing was reported in several rumen species, results interestingly depending on the type of the medium used in autoinducer bioassay (Mitsumori *et al.*, 2003).

Different substrates used, especially glucose, can significantly affect the outcome of AI-2 bioassay, even at low concentrations (DeKeersmaecker and Vanderleyden, 2003; Turovskiy and Chikindas, 2006). Modification and optimization of the protocol is important for the reproducibility and reliability of quorum sensing bioassay (Vilchez *et al.*, 2007). We have tested the influence of sampling time and the substrate used in chemically defined medium CD on reporter strain luminescence signal, and in this paper we report on our examination on four ruminal *Prevotella* strains, *Prevotella bryantii* B₁₄, TC1-1 and TF1-3, and *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A for the presence of AI-2 type quorum sensing systems.

Strictly anaerobic Gram-negative bacteria from the genus *Prevotella* represent one of the most abundant and thus major bacterial populations within ruminant gut. They may constitute up to 70% of the culturable bacterial population from the ruminal samples (Van Gylswyk, 1990). The abundance of these bacteria in rumen fluid was confirmed also by several molecular enumeration studies (Wood *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 2001; Reilly *et al.*, 2002; Stevenson and Weimer, 2007).

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions used

Four strictly anaerobic ruminal strains from genus *Prevotella* were used in this study: *P. bryantii* B₁₄, *P. bryantii* TC1-1, *P. bryantii* TF1-3 and *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A. The origin of the strains was described previously (Avguštin *et al.*, 1997). Strains were grown in chemically defined media CD, described by Scott and Dehority (1965). 0.4% (w/v) glucose, 0.4% (w/v) cellobiose or 0.4% (w/v) of each glucose and cellobiose were used as a substrate. Bacterial strains were incubated in 10 ml of CD medium under anaerobic conditions at 39 °C for 1–2 days until maximum growth. The cultures were then separated into bacterial cells and culture supernatants by centrifugation at 10.000 x g for 15 min at 4 °C. Cell-free supernatants were stored at –20 °C until use in the autoinducer bioassay.

Two strains of *V. harveyi* (obtained from ATCC) were used in AI-2 autoinducer assay. *V. harveyi* BB170 (sensor 1[–], sensor 2⁺) was used as the reporter strain and *V. harveyi* BB152 (AI-1[–], AI-2⁺) was used as the producer of AI-2 molecules. Strains were grown overnight in AB medium (Greenberg *et al.*, 1979). Cell-free supernatant of *V. harveyi* BB152 was obtained in the same way as from *Prevotella* strains, and served as the positive control.

Autoinducer bioassay

The bioassay for detection of AI-2 molecules, reported by Surette and Bassler (1998) was used. Optimizations of the protocol were made as suggested by Vilchez *et al.* (2007), and DeKeersmaecker and Vanderleyden (2003). *V. harveyi* BB170 reporter strain was grown overnight at 30 °C in AB medium until optimum optical density of 1.0–1.1 at 600 nm was reached. The culture was then diluted 1:5000 in fresh AB medium to obtain 10^5 CFU ml⁻¹. 1 ml of the cell-free supernatant from tested ruminal strains, *V. harveyi* BB152 (positive control) or sterile CD medium (negative control) was added to 9 ml of diluted reporter strain, thoroughly mixed and then incubated at 30 °C with aeration (175 RPM). Within next 6 hours every hour a sample of bioassay mixture was retrieved, 5-fold diluted in 2% NaCl solution and the stimulation of light production in *V. harveyi* BB170 reporter strain was measured by luminometer (LKB Wallac 1251).

RESULTS AND DISCUSSION

As reported previously, AI-2 production is growth-medium dependent (Burgess *et al.*, 2002). Media composition can greatly influence the growth and luminescence of *V. harveyi* reporter strain BB170, as samples of the tested cultures are added to reporter strain in relatively large portion, i.e. 10% of the total volume. The presence of residual glucose in medium even at low concentrations (2 mM) completely inhibits the luminescence of reporter strain (DeKeersmaecker and Vanderleyden, 2003). Nevertheless, glucose enables the reporter strain to grow faster than glycerol, which is the only carbon source in AB medium. It was shown that the presence of glucose in AB medium at 1.25 g/l can promote up to 7-times faster growth, causing higher densities of reporter strain and self-response during the bioassay. Bioluminescence should be detected in response to the added AI-2 only at lower cell densities (no larger than 10^6 – 10^7 CFU ml⁻¹) of reporter strain, with the concentration of glucose below the level of inhibition (Turovskiy and Chikindas, 2006).

As reporter strain produces and senses its own autoinducer molecules, the time of the assay is of crucial importance. The measurement at the time with the most pronounced difference between positive and negative controls is considered the most informative. Our experiments confirm (Figure 1) that this difference is maximal 5 hours after inoculation, when interference by endogenous AI-2 of the reporter is less than 3% of bioluminescence signal, regardless of the substrate used in chemically defined medium CD. The cell-free CD medium without added substrate was also submitted to bioassay. Compared to CD medium with added substrates, no significant differences of luminescence in reporter strain were observed, therefore indicating that the concentration of residual glucose in growth medium was below the level of bioluminescence inhibition.

All *P. bryantii* strains reached maximum growth rapidly, with optical density of more than 1.6 at 600 nm after only 18 h of incubation, whereas *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A achieved maximum growth more slowly, after 40–64 h (data not shown). Only after population transitions into the stationary phase, the concentration of AI-2 emerges at its peak (Turovskiy and Chikindas, 2006). The level of AI-2 then remains relatively constant all throughout the stationary phase with less than 1% change during 27 hours after entering the stationary phase (Surette and Bassler, 1998). The time of collecting the tested cell-free culture samples is therefore of less importance, provided that cultures had reached the stationary phase.

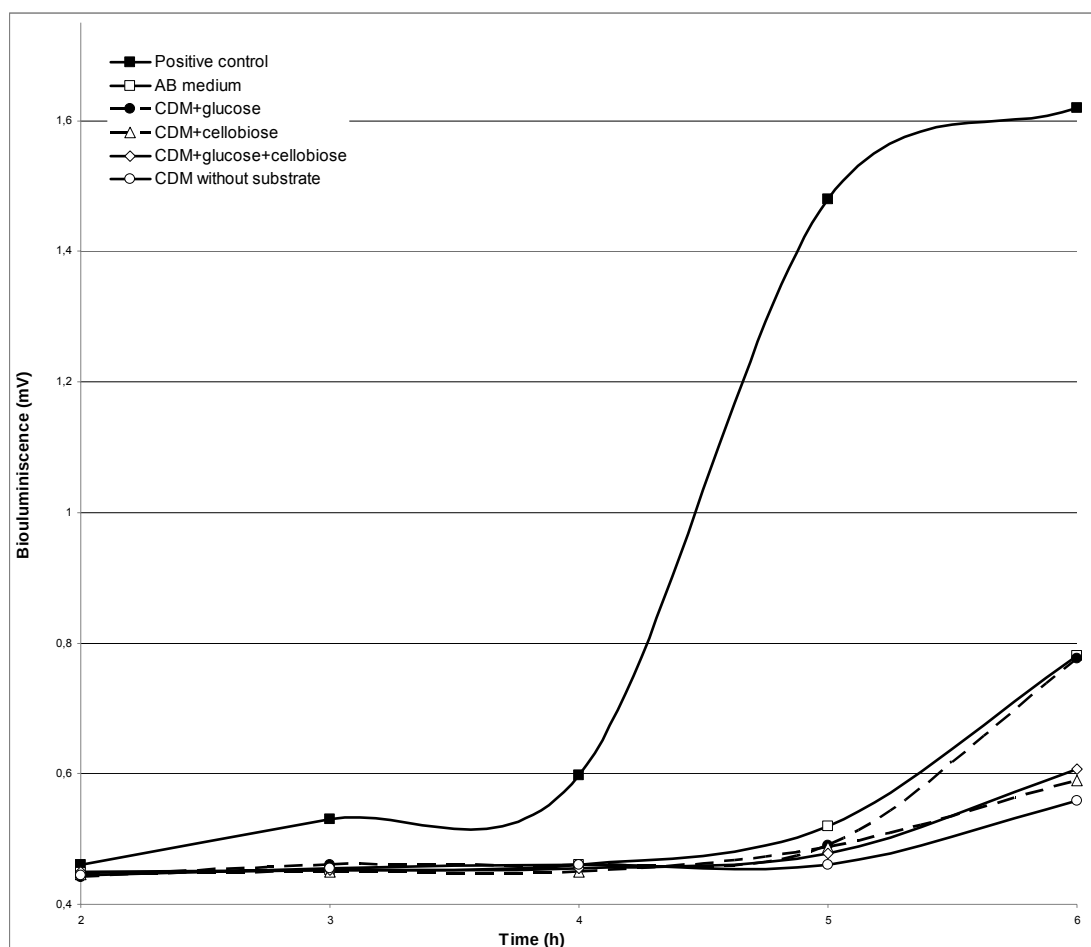


Figure 1. Determination of optimal time for autoinducer bioassay, using different media and substrates. Data is shown in absolute values of luminometer measurements. Samples were retrieved every hour during 6 hours of observation. Bioluminescence of the positive control grows slowly during the first 4 hours, after which it starts to peak rapidly. Bioluminescence of the samples from chemically defined medium CD (CDM) with different added substrates remains at the same level during the first 4 hours, and then starts to grow gradually due to the endogenously produced AI-2 of the reporter strain. The largest difference between bioluminescence measurements of positive control and the samples from chemically defined medium CD emerges 5 hours after inoculation.

Slika 1. Določanje optimalnega časa biološkega testiranja ob uporabi različnih gojišč in substratov. Prikazane so absolutne vrednosti meritev z luminometrom. Vzorci so bili odvzeti vsako uro, skupaj 6 ur. Bioluminiscenca pozitivne kontrole počasi raste prve 4 ure, nato pa se začne hitro povečevati. Bioluminiscenca vzorcev iz kemijsko definiranih gojišč CD (CDM) z dodanimi različnimi substrati praktično ne narašča do 4. ure, potem pa se postopoma povečuje zaradi nastajanja endogenih avtoinduktorskih molekul tipa 2 reporterskega seva. Največja razlika med bioluminiscenco pozitivne kontrole in vzorcev iz kemijsko definiranih gojišč CD se pojavi po 5 urah rasti.

Using the *V. harveyi* BB170 bioassay, considering culture cell density and growth time, we have clearly demonstrated the presence of AI-2 quorum sensing system in *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A, but not in any of the *P. bryantii* strains. *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A induced more than 74% of reporter *V. harveyi* BB170 bioluminescence, regardless of the substrate used in chemically defined medium CD (Figure 2).

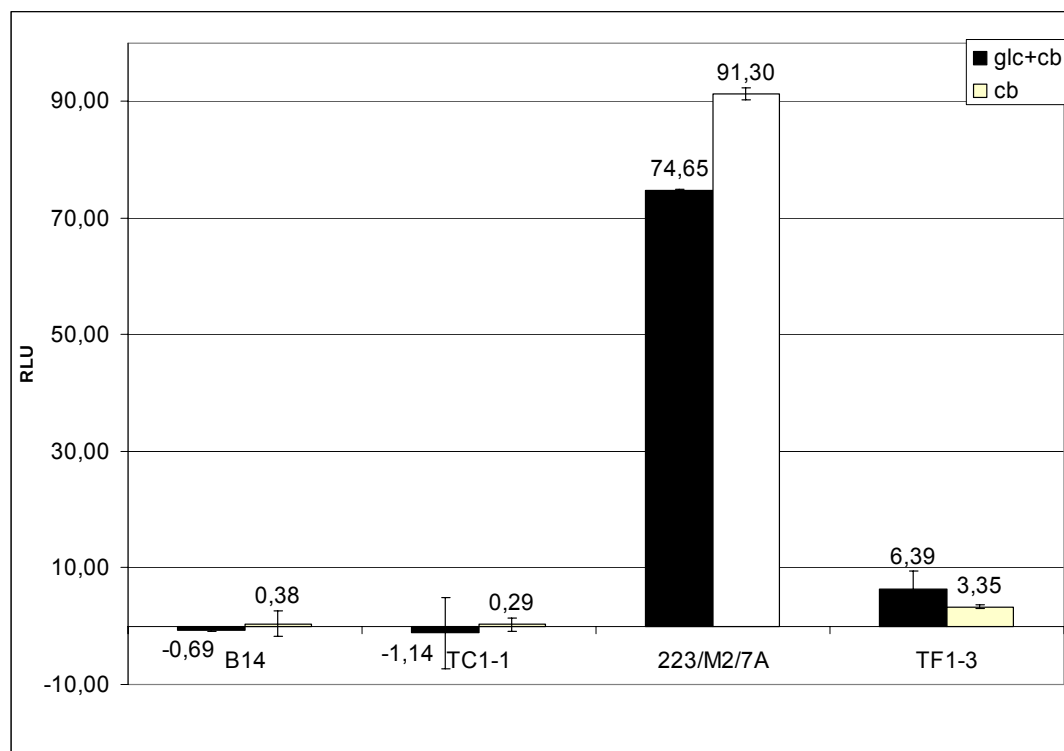


Figure 2. Average light induction in AI-2 bioassays of ruminal strains from the genus *Prevotella*. Bioluminescence values are shown in relative light units (% induction of bioluminescence in positive control). Black bars denote samples from chemically defined medium CD with added glucose and cellobiose as a substrate. White bars denote samples from chemically defined medium CD with added cellobiose as a substrate.

Slika 2. Povprečne vrednosti indukcije svetlobe pri biološkem testiranju avtoinduktorskih molekul tipa 2 pri sevih rodu *Prevotella* iz vampa. Vrednosti bioluminescence so prikazane v relativnih enotah svetilnosti (delež indukcije bioluminescence pri pozitivni kontroli v %). Črni stolpci označujejo vzorce iz kemijsko definiranega gojišča CD z dodano glukozo in celobiozo. Beli stolpci označujejo vzorce iz kemijsko definiranega gojišča CD z dodano celobiozo.

Partial substitution of glucose in some cases increases, in other oppositely decreases the induction of bioluminescence in reporter strain, but never changes the outcome of bioassay. The increase in light production could be attributed to significant increase in growth rates of reporter strain due to addition of easily accessible substrate, as decrease could be caused by inhibition effect of glucose on bioluminescence.

In *P. bryantii* B₁₄, *P. bryantii* TC1-1 and *P. bryantii* TF1-3 stimulation of bioluminescence, indicating the presence of quorum sensing system, was not observed. Despite *P. bryantii* strain TF1-3 induced significantly more light production in reporter strain than other *P. bryantii* strains, its 3.35–6.39% induction was below 10% induction threshold, sufficient for confirmation of AI-2 molecules (Bassler *et al.*, 1997).

We cannot affirm that the *P. bryantii* strains that didn't induce significant bioluminescence of reporter strain do not possess quorum sensing systems of any type. In addition to the abovementioned factors that notably influence the autoinducer bioassay, the difference in autoinducer molecule structure between bacteria from the genus *Prevotella* and *V. harveyi*, two phylogenetically relatively distant bacteria taxons, could cause the inability for successful interspecies communication and consecutive failure to detect it by using the *V. harveyi* autoinducer bioassay. Alternatively, one could employ the chemical detection of AI-2 by HPLC

or GC, but at the present these methods are rarely used due to the instability and low concentrations of AI-2 molecules in biological samples (Vilchez *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

Our experiments confirmed that the signal of *V. harveyi* reporter strain is minimal 5 hours after inoculation, when interference by endogenous AI-2 of the reporter is less than 3% of bioluminescence signal, regardless of the presence of glucose in chemically defined medium CD. As it was expected, using *V. harveyi* BB170 bioassay, considering culture cell density and growth time, we have demonstrated the presence of AI-2 quorum sensing system in ruminal *Prevotella* strains. *P. ruminicola*-like strain 223/M2/7A induced more than 74% of reporter *V. harveyi* BB170 bioluminescence, regardless of the presence of glucose in chemically defined medium CD, however, such induction of bioluminescence was not observed in *P. bryantii* strains.

REFERENCES

- Avguštin, G./ Wallace, J.R./ Flint, H.J. Phenotypic diversity among rumen isolates of *Prevotella ruminicola*, proposal for redefinition of *Prevotella ruminicola* and the creation of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella bryantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1997), 284–288.
- Avguštin, G./ Ramšak, A./ Peterka, M. Systematic and evolution of ruminal species of the genus *Prevotella*. *Folia Microbiologica*, 46(2001), 40–44.
- Bassler, B.L./ Greenberg, E.P./ Stevens, A.M. Cross-Species Induction of Luminiscence in the Quorum-Sensing Bacterium *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 179(1997), 4043–4045.
- Bassler, B.L./ Losick, R. Bacterially speaking. *Cell*, 125(2006), 237–246.
- Burgess, N.A./ Kirke, D.F./ Williams, P./ Winzer, K./ Hardie, K.R./ Meyers, N.L./ Aduse-Opoku, J./ Curtis, M.A./ Camara, M. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. *Microbiology*, 148(2002), 763–772.
- DeKeersmaecker, S.C./ Vandrleyden, J. Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter. *Microbiology Comment*, 149(2003), 1953–1956.
- Erickson, D.L./ Nsereko, V.L./ Morgavi, D.P./ Selinger, L.B./ Rode, L.M./ Beauchemin, K.A. Evidence of quorum sensing in the rumen ecosystem: detection of N-acyl homoserine lactone autoinducers in ruminal contents. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(2002), 374–378.
- Greenberg, E.P./ Hastings, J.W./ Ulitzur, S. Induction of luciferase synthesis in *Beneckeia harveyi* by other marine bacteria. *Archives of Microbiology*, 120(1979), 87–91.
- Miller, M.B./ Bassler, B.L. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55(2001), 165–199.
- Mitsumori, M./ Xu, L./ Kajikawa, H./ Kurihara, M./ Tajima, K./ Hai, J./ Takenaka, A. Possible quorum sensing in the rumen microbial community: detection of quorum-sensing signal molecules from rumen bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 219(2003), 47–52.
- Reilly, K./ Carruthers, V.R./ Attwood, G.T. Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. *Microbial Ecology*, 43(2002), 259–270.
- Scott, H.W./ Dehority, B.A. Vitamine requirement of several cellulolytic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 89(1965), 1169–1175.
- Stevenson, D.M./ Weimer, P.J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(2007), 165–174.
- Surette, M.G./ Bassler, B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1998), 7046–7050.
- Surette, M.G./ Miller, M.B./ Bassler, B.L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1999), 1639–1644.
- Tajima, K./ Aminov, R.I./ Nagamine, T./ Matsui, H./ Nakamura, M./ Benno, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 67(2001), 2766–2774.

- Turovskiy, Y./ Chikindas, M.L. Autoinducer-2 bioassay is a qualitative, not quantitative method influenced by glucose. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2006), 497–503.
- Van Gylswyk, N.O. Enumeration and presumptive identification of some functional groups of bacteria in the rumen of dairy cows fed grass silage-based diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(1990), 243–254.
- Vilchez, R./ Lemme, A./ Thiel, V./ Schulz, S./ Sztajer, H./ Wagner-Döbler, I. Analysing traces of autoinducer-2 requires standardization of the *Vibrio harveyi* bioassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(2007), 489–496.
- Wood, J./ Scott, K.P./ Avguštin, G./ Newbold, C.J./ Flint, H.J. Estimation of the relative abundance of different *Bacteroides* and *Prevotella* ribotypes in gut samples by restriction enzyme profiling of PCR-amplified 16S rRNA gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1998), 3683–3689.

ANALIZA TOKSIČNOSTI IN GENOTOKSIČNOSTI JEZERSKIH VODA Z BIOTESTI

Ilja Gasan OSOJNIK ČRNIVEC ^{a)} in Romana MARINŠEK-LOGAR ^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška Fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija,

^{b)} isti naslov kot ^{a)}, prof., dr., mag., e-pošta: romana.marinsek@bfro.uni-lj.si.

Delo je prispelo 14. novembra 2007, sprejeto 03. decembra 2007.

Received November 14, 2007, accepted December 03, 2007.

IZVLEČEK

Ustrezno izvajanje ukrepov za obvladovanje problematike onesnaženosti prostora je v veliki meri odvisno od nepretrganega spremljanja trenutnega stanja okolja. Zakonsko predpisane preiskave v Sloveniji večinoma temeljijo na spremljanju fizikalnih in kemijskih kazalcev. Ker s takimi analizami ne moremo ugotoviti biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu in bioaktivacije, je za celovitejši pregled mehanizmov in intenzivnosti vplivov okolja na organizme kemijsko fizikalne podatke potrebno dopolniti še z rezultati bioloških testov za toksičnost in genotoksičnost. V tej raziskavi smo preizkusili primernost komercialnega testnega kita za ugotavljanje toksičnosti Thamnotoxkit FTM s sladkovodnim rakcem *Thamnocephalus platyurus*, primernost mikrobne testa Ames s sevi TA97, TA98 in TA100 bakterije *Salmonella typhimurium* in kometnega testa z evkariontskim mikroorganizmom *Tetrahymena thermophila* za ugotavljanje genotoksičnosti. Z izbranimi biotesti smo ovrednotili toksičnost in genotoksičnost vzorcev jezerske vode iz vzorčnih lokacij v Šaleški dolini in biološke učinke primerjali z izmerjenimi fizikalno-kemijskimi parametri.

Ključne besede: mikrobiologija / toksičnost / genotoksičnost / jezera / biotesti / varstvo okolja

EVALUATION OF TOXIC AND GENOTOXIC POTENTIAL IN LAKE WATER SAMPLES BY BIOASSAYS

ABSTRACT

Preservation of the natural resources, valuable natural features and spatial characteristics plays an important role in the environmental management and is based on permanent environmental monitoring. For the time being, the current legislation regarding environmental monitoring in Slovenia is based mostly upon physicochemical analyses. Since the physicochemical analyses do not provide information about biological effects, interactions between sample compounds and bioactivation, bioassays have been considered for environmental monitoring supplementation. In the present study the adequacy of a commercial toxicity screening test Thamnotoxkit FTM, which includes a freshwater crustacean *Thamnocephalus platyurus* and two genotoxicity determination test, a standard microbial Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA100 strains and the comet assay with the eukaryotic microorganism *Tetrahymena thermophila* has been evaluated. With the selected biotests toxic and genotoxic effects of lake water samples from Šalek valley were evaluated and compared with the measured physicochemical values.

Key words: microbiology / toxicity / genotoxicity / lakes / bioassays / environmental protection

UVOD

Rast svetovnega prebivalstva in razvoj ter povečanje proizvodnje in obsega industrializacije sta povzročila povečano kopičenje onesnaževal v okolju. Navkljub poznavanju tehnologij, ki nam omogočajo obdelavo, recikliranje in ponovno uporabo odpadnih snovi, okolje še vedno obremenjujemo z izpusti v atmosfero, hidrosfero in litosfero. Prisotnost onesnaževal v okolju je spodbudila potrebo po razvoju dovolj natančnih metod, s katerimi bi lahko ovrednotili škodljive vplive snovi na prisotne organizme, še posebno na zdravje ljudi.

Zakonsko predpisane preiskave iz sklopa monitoringa okolja (površinskih voda) so večinoma utemeljene na spremljanje fizikalnih in kemijskih kazalcev (Resolucija., Ur.l. RS, 2006; Uredba., Ur.l. RS, 2002). Pri izvajanju fizikalno-kemijskih analiz smo omejeni s spodnjo mejo občutljivosti, prav tako pa lahko z njimi zaradi cenovnih ali analitskih omejitev spremljamo le omejen nabor parametrov. S temi analizami ne moremo zaznati biološkega učinka, medsebojnega vpliva posameznih sestavin v vzorcu, deleža snovi, ki je organizmom dostopen in snovi, ki postanejo škodljive po bioaktivaciji (Josephy in sod., 1997; Derksen, 2002).

Pomembna orodja v ekotoksikoloških raziskavah so bioanalitske metode. Ob pravilni izbiri testnega organizma v biotestu razmeroma učinkovito dopolnimo omenjene pomanjkljivosti fizikalno-kemijskih testiranj. Z ustreznim biotestom lahko potrdimo biološki učinek potencialnih onesnaževal v vzorcu na testne organizme, ne moremo pa identificirati specifičnih snovi, ki so za odziv odgovorne (Derksen, 2002, Fendt, 2003). Pravni okvir za vključevanje biotestov v monitoring vodnih virov podaja t.i. Vodna direktiva 2000/60/EC, ki v aneksu v programu monitoringa ob spremljanju hidroloških in fizikalno-kemijskih parametrov predvideva tudi spremljanje bioloških elementov kakovosti vodnih teles.

Šaleška dolina je zaradi svoje obremenjenosti z raznolikimi onesnaževali kmetijskega in industrijskega izvora vzorčni primer, kjer na onesnaženje vplivajo številne toksične snovi, zapletene in nam pogosto nepoznane strukture in kjer za potrebe izvajanja ukrepov izboljševanja stanja okolja zgolj izvajanje rutinskih fizikalno-kemijskih raziskav ni dovolj. Biološke metode, ki se v takšnih razmerah izkažejo primerne za vrednotenje (geno)toksičnosti, se v nadaljevanju lahko uporabijo za dopolnitev monitoringa okolja na državni ravni.

Za preverjanje toksičnosti vzorcev jezerske vode smo v raziskavi preizkusili testni set Thamnotoxkit FTM s sladkovodnim rakcem *Thamnocephalus platyurus*. Za ugotavljanje genotoksičnosti jezerskih vzorcev pa smo izbrali standardni test Ames s sevi TA97, TA98 in TA100 bakterije *Salmonella typhimurium* in kometni test z migetalkarjem *Tetrahynema thermophila*. Pri biološkem testiranju toksičnosti in genotoksičnosti smo sledili sodobnemu konceptu 3R, ki uveljavlja predvsem alternativne metode biološkega testiranja z mikroorganizmi in organizmi na nižjih stopnjah evolucijskega razvoja.

MATERIAL IN METODE

Vzorci jezerskih voda

Šaleška dolina je bila v preteklih desetletjih med okoljsko najbolj obremenjenimi regijami v Sloveniji. Premogovništvo in pridobivanje električne energije spreminjata kvaliteto in fiziognomijo regije z emisijami nevarnih dimnih plinov, pepela in drugih produktov, ki nastanejo pri pridobivanju termoenergije ter s spreminjanjem reliefa montanogenega ugrezanja površja (Šalej, 2002).

Iz ugrezninskih jezer smo odvzeli štiri vzorce (J1 – Družmirsko jezero; J2 – Velenjsko jezero pri nasipu pepela; J3 – Velenjsko jezero pri čolnarni, na drugi strani kot J2; J4 – Škalsko jezero) in jih do uporabe shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fizikalno-kemijske analize jezerskih voda

Na vzorcih jezerske vode smo opravili večino fizikalno-kemijskih analiz, ki so predpisane v programu monitoringa jezer (2006).

Iz sklopa meritev na terenu smo ovrednotili motnost (SIST EN ISO 7027, 2000), redoks potencial (SIST DIN 38404-6; 2000), vrednost pH in temperaturo (SIST ISO 10523, 1996).

Iz sklopa analiz vode smo testirali vsebnosti celotnega organskega in raztopljenega organskega ogljika (SIST ISO 8245, 2000), amonijevega (Hach DR/400 Spectrophotometre Handbook, 1999) in nitratnega ter nitritnega dušika, sulfatov in kloridov (SIST EN ISO 10304-2, 1998), skupnega fosforja (SIST EN ISO 6878, 2004), kalcija in magnezija (SIST ISO 7980, 2000) ter natrija in kalija (SIST ISO 9964/1&3, 2000).

Opravili smo analize sledečih težkih kovin: raztopljenega bakra, kadmija, kroma, niklja, svineca, arzena in cinka (SIST DIN 38406-29, 2000) ter živega srebra (SIST ISO 5666, 2000).

Analizirali smo tudi vsebnost policikličnih aromatskih ogljikovodikov: benzopirena, fluorantrena, benzo fluorantrena, benzoperilena, indenopirena, naftalena, acenaftilena, acenaftena, fluorena, fenatrena, antracena, pirena, benzoantracena, krizena in dibenzoantracena (SIST EN ISO 17993, 2004 in EPA Method 550.1, 1990).

Thamnotoxkit FTM

Postopek testa smo izvedli po navodilih proizvajalca (Microbiotests Ltd., Belgium; Standard Operational Procedure for Thamnotoxkit FTM, 2006).

Pred samo izvedbo testa smo najprej vitalizirali ličinke organizma iz mirujočih cist. Ciste smo rehidrirali in 20 do 22 ur inkubirali pri temperaturi 25°C in pri neprekinjeni osvetlitvi 2800 lux. Nato smo za vsak vzorec jezerske vode pripravili pet različnih redčitev (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %) in ličinke redčitvenim vrstam vzorcev izpostavili v testnih ploščah (4 vrste in 6 stolpcev vdolbin). Po 24 urni inkubaciji testnih plošč pri 25°C v temi smo pod lupo prešteli število mrtvih rakcev.

Rezultate testa Thamnotoxkit FTM izrazimo s parametrom LC₅₀, t. j. kot koncentracijo vzorca, ki je smrtna za 50 % testne populacije.

Za negativno kontrolo, valjenje cist in pripravo redčitvene vrste vzorcev smo uporabljali raztopino, ki jo v svojih metodah za ugotavljanje akutne toksičnosti z vodnimi organizmi priporoča Ameriška agencija za varstvo okolja (Standard methods for ..., 2006).

Test Ames

Test Ames smo izvajali po postopku, ki sta ga opisala Maron in Ames (1983) s sevi TA97, TA98 in TA100 bakterije *Salmonella typhimurium* brez in z vključitvijo metabolne aktivacije z mešanico S9 (homogenat podganjih jeter). Kolonije smo prešteli po 48 urni inkubaciji na petrijevih ploščah pri 37°C.

Mutageno aktivnost vzorcev smo izrazili s faktorjem indukcije (frekvenco mutacij). V skladu s priporočili organizacij EPA in OECD, s testom Ames mutageni potencial vzorca potrdimo, kadar je frekvenca mutacij testne snovi 2,0 ali večja. Če je vrednost količnika frekvence mutacij vzorca in negativne kontrole med 1,7 in 1,9, tedaj lahko govorimo o potencialno mutagenem učinku testirane snovi. Če pa je ta vrednost nižja od 1,6 testni snovi ne pripisujemo mutagenega potenciala.

Za pozitivne kontrole testa smo uporabili ICR-191 akridin (ICR), 4-nitroquinolin-N-oksidi (4NQO), bezo piren (BP) in 2-aminofluoren (2AF) raztopljene v dimetil sulfoksidu (DMSO) in natrijev azid (NA) v vodi Mili-Q.

Rezultate testa Ames smo statistično ovrednotili z programom GraphPadPrism, 3.02. Analizo variance smo opravili z enosmernim in neparametričnim postopkom ANOVA (Kruskal-Wallis test), test razlik med obravnavanimi skupinami pa s postopkom večkratne primerjave Dunnett C.

Kometni test z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila*

Kometni test ali elektroforezo posameznih celic, ki so ga razvili Singh in sod. (1988), smo prilagodili postopku, ki ga je za različico z migetalkarjem *Tetrahymena thermophila* razvila Lah (2004). Celice smo gojili v aksenični laboratorijski kulturi v bogatem gojišču za praživali (Schultz, 1997).

24 ur pred izvedbo testa smo kulturo praživali inokulirali v gojišča z vklopljenimi vzorci, ki smo jih sterilizirali s filtracijo skozi 0,22 µm membranske filtre. Po 24 urah smo migetalkarje vklopili v agarozne minigele na mikroskopskih objektivih. Sledila je alkalna liza celic (pH = 12,4), razvijanje DNA v elektroforetskem pufru, elektroforeza in nevtralizacija. DNA smo obarvali z etidijevim bromidom. Poškodbe jedrne DNA smo ovrednotili z epifluorescentnim mikroskopom in digitalno kamero ter programskim paketom Komet 5.0 za računalniško analizo slike.

Za oceno genotoksičnosti smo izbrali parameter repni moment po Olivu (RM-Olive), ki upošteva vrednosti zajetih signalov v glavi in repu kometa: $RM-Olive = (DNA_{glava} - DNA_{rep}) \times \%DNA_{rep} \times 0,01$ (Olive in sod., 1990). Pozitivni rezultat kometnega testa je statistično značilno povečanje genotoksičnosti v primerjavi z negativno kontrolo. Za negativno kontrolo smo gojili praživali *Tetrahymena thermophila* v gojišču z vklopljeno vodo MQ. Za pozitivno kontrolo smo celice iz istega gojišča izpostavili 500 mikro molarini raztopini vodikovega peroksida.

Za statistično analizo podatkov smo prilagodili metodo, ki so jo opisali Verde in sod. (2006). Rezultate smo analizirali s programskim paketom R. Osnovne statistične parametre smo določili s pomočjo vgrajenih funkcij, razvoj in obdelavo modelov pa smo opravili z dodatkom za analizo preživetja, 'survival'.

REZULTATI IN RAZPRAVA

V industriji, kmetijstvu in domačih gospodinjstvih dandanes uporabljamo številne potencialno (geno)toksične kemijske spojine (težke kovine, policiklične aromatske ogljikovodike (PAH), poliklorirane bifenile (PCB), pesticide...) Te snovi, še posebno ksenobiotiki, so navzoče v kompleksnih mešanica, ki so za prisotne organizme pogosto mutagene (Ohe in sod., 2004).

V naši raziskavi smo z uporabo fizikalno-kemijskih analiz skušali ugotoviti koncentracije težkih kovin, PAH, pH, redoks potenciala, sulfatov, fosfatov, dušika in ogljika (pregl. 1). Ti parametri lahko pomembno vplivajo na toksični in genotoksični potencial vzorca (Nieboer in Richardson, 1980), ki smo ga preverili s testom toksičnosti Thamnotoxkit FTM, s testom mutagenosti Ames in s kometnim testom kot enim najobčutlivejših testov za geotoksičnost.

Uredba o kemijskem stanju površinskih voda (Uredba., Ur.l. RS, 2002) določa mejne vrednosti fizikalno-kemijskih parametrov in merila za čezmerno obremenjenost površinskih voda. Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode (pregl. 1) so pokazale, da nobeden od preiskovanih parametrov jezerske vode iz izbranih vzorčnih območji (J1–J4) ni presegel predpisanih mejnih vrednosti. Vsebnosti vseh preiskovanih policikličnih aromatskih ogljikovodikov so bile pod mejo kemijske detekcije (<0,04 µg L⁻¹; rezultati niso prikazani v preglednici 1).

Rezultati testa Thamnotoxkit FTM so za vse jezerske vzorce v vseh redčitvah pokazali tako majhno smrtnost testnega organizma, da izračun LC₅₀ ni bil smiseln za nobeno od ponovitev testa (rezultati niso prikazani). Odzivi so se pri posameznih vzorcih nekoliko razlikovali, vendar smrtnost testnega organizma v nobenem primeru ni presegla 10 %, ki jih po normativih testa sicer lahko doseže sama negativna kontrola (Microbiotests Ltd., Belgium, Standard Operational Procedure for Thamnotoxkit FTM, 2006). Možno, je, da toksičnosti nismo dokazali zaradi filtracije vzorcev pred testiranjem, s čimer smo lahko odstranili del toksičnega bremena vzorca.

Preglednica 1. Fizikalno-kemijske analize vzorcev jezerske vode
Table 1. Physico-chemical parameters of lake water samples

Parameter	Enote	Vzorec			
		J1	J2	J3	J4
Meritve na terenu					
Temperatura	°C	17,6	18,2	17,3	17,5
Vrednost pH	/	8,60	8,28	8,26	8,29
Redoks potencial	mV	484	489	483	487
Motnost	FTU	7	14	7	15
Analize vode					
Ogljik – celotni organski TOC	mgC L ⁻¹	13,1	14,5	16,4	17,7
Ogljik – raztopljeni organski DOC	mgC L ⁻¹	8,97	9,97	10,90	11,80
Amonijev dušik	mgN L ⁻¹	0,16	0,16	0,22	0,22
Nitratni dušik	mgN L ⁻¹	0,55	1,02	1,04	0,79
Nitritni dušik	mgN L ⁻¹	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3
Sulfat	mg L ⁻¹	38,5	44,5	8,73	28,5
Klorid	mg L ⁻¹	5,84	29,60	30,10	12,40
Fosfor celotni – F	mg L ⁻¹	0,05	0,03	0,04	0,03
Kalcij – Ca	mg L ⁻¹	52,4	211,0	214,0	67,6
Magnezij – Mg	mg L ⁻¹	14,0	15,2	14,2	20,8
Natrij – Na	mg L ⁻¹	6,66	59,20	58,70	8,32
Kalij – K	mg L ⁻¹	2,31	42,8	42,4	2,34
Težke kovine					
Arzen raztopljeni – As	µg L ⁻¹	<0,5	1,3	1,4	0,5
Svinec raztopljeni – Pb	µg L ⁻¹	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Živo srebro – Hg	µg L ⁻¹	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20
Kadmij raztopljeni – Cd	µg L ⁻¹	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
Krom raztopljeni – Cr	µg L ⁻¹	<5,0	<5,0	<5,0	<5,0
Nikelj raztopljeni – Ni	µg L ⁻¹	<1,0	1,5	1,7	<1,0
Cink raztopljeni – Zn	µg L ⁻¹	<2,0	18,1	3,3	<2,0
Baker raztopljeni – Cu	µg L ⁻¹	<1,0	1,1	1,3	<1,0

Test akutne toksičnosti Thamnotoxkit FTM spada v skupino mikrobiotestov. Ti biotesti zavzamejo malo laboratorijskega prostora, so cenovno ugodni, preprosti, hitri in občutljivi ter dajejo ponovljive rezultate (Derksen, 2002). Thamnotoxkit FTM spada med najobčutljivejše mikrobioteste (Willemsen in sod., 1995). V Sloveniji uporaba tega razmeroma novega testa toksičnosti še ni razširjena. Sladkovodni škrgonožec *Th. Platyurus*, ki ga uporabljamo v tem testu, je ubikvitaren vodni organizem. Njegov najpogostejši življenjski prostor so presihajoči ribniki, začasna jezera in luže. V ekotoksikoloških raziskavah s sladkovodnimi rakci pogosto vrednotimo prisotnost toksičnih učinkov onesnaževal v vzorcih površinskih voda (Stark in Banks, 2003). Zaradi navedenih vzrokov je bil ta biotest v raziskavi toksičnosti jezerskih voda tudi izbran. Kljub temu, da rezultati testa akutne toksičnosti Thamnotoxkit FTM niso potrdili toksičnega učinka vzorcev jezerske vode, toksičnosti na podlagi enega biotesta še ne moremo izključiti. Za boljši pregled toksičnih učinkov jezerskih voda iz Šaleške doline in biološke ustreznosti preizkušenega testnega kita bi bilo potrebno vzorce pregledati še z drugimi testi toksičnosti v katerih so zastopani testni organizmi z različnih taksonomskih nivojev in z različni končni odzivi.

Rezultati testa Ames z in brez vključitve metabolne aktivacije so predstavljeni v preglednici 2. S sevom TA97 smo pri testu z aktivacijo dokazali mutageni potencial vzorcev 2 in 3. Pri testu brez aktivacije kaže potencialni mutageni učinek le vzorec 2 (pregl. 2).

Table 2. Results of the Ames test with (+S9) and without (–S9) activation of four lake water samples tested with the bacteria *S. typhimurium* strains TA97, TA98 and TA100 expressed as mean (P) and standard deviation (SD) of revertants/plate and induction factors (IF)

Preglednica 2. Rezultati Ames testa z (+S9) in brez (–S9) aktivacije vzorcev jezerske vode, testiranih s TA97, TA98 in TA100 sevi bakterije *S. typhimurium*, podani kot povprečje (P) in standardni odklon (SD) števila revertant/ploščo in faktor indukcije (IF)

Vzorec	TA97		TA98		TA100	
	Št. revertant ploščo	Faktor indukcije	Št. revertant Ploščo	Faktor indukcije	Št. revertant ploščo	Faktor indukcije
–S9						
Negativna kontrola	60,5±20,5	1	26±3	1	87,0±5,3	1
	P±SD	IF±SD	P±SD	IF±SD	P±SD	IF±SD
J1	91,0±36,8	1,50±0,50	25,6±6,8	0,98±0,26	86,9±12	0,99±0,14
J2	105,5±24,8	1,74±0,35	19,9±3,4	0,76±0,13	73,2±13,7	0,84±0,15
J3	98,8±11,1	1,63±0,22	24,8±5,2	0,95±0,20	68,6±15,3	0,78±0,17
J4	71,7±24,9	1,18±0,36	22±4,4	0,84±0,17	78,1±9,2	0,89±0,10
ICR (0,1 µg/ploščo)	163,3±25,9	2,7±0,43				
4NQO (0,5 µg/ploščo)			347,5±4,9	13,4±0,21		
NA (3,0 µg/ploščo)					221,3±7,4	2,54±0,08
+S9						
Negativna kontrola	59,0±6,2	1	15,7±3,2	1	65,5±4,9	1
	Povp.±SD	IF±SD	povp.±SD	IF±SD	povp.±SD	IF±SD
J1	75,5±31,3	1,28±0,57	19,3±3,5	1,23±0,23	66,1±12	1,00±0,18
J2	131,1±33,2	2,22±0,55	18,1±6,3	1,15±0,42	63,3±16,1	0,96±0,26
J3	139,9±18,6	2,37±0,15	21,9±4,5	1,39±0,28	63,6±17,1	0,97±0,26
J4	96,8±18,2	1,64±0,25	21,1±5,2	1,34±0,33	48,8±8,3	0,74±0,12
BP (50 µg/ploščo)	104,0±13,0	1,76±0,21				
2AF (10 µg/ploščo)			494,7±4,0	31,50±2,51	191,0±35,2	2,92±0,67

Test Ames se zelo pogosto uporablja v monitoringu mutagenosti voda in je najbolj validiran in razširjen *in vitro* test za identifikacijo mutagenega potenciala tako posameznih poznanih snovi kot kompleksno sestavljenih okoljskih vzorcev. S testom dokazujemo sposobnost sestavin vzorca za indukcijo točkovnih mutacij, ki so vzrok številnih genetskih bolezni. Pozitivni rezultati tega bakterijskega testa kažejo, da testna snov/mešanica snovi inducira točkovne mutacije z zamenjavo baz ali premikom bralnega okvirja v genomu *Salmonella typhimurium*. Negativni rezultati kažejo, da testna snov/mešanica snovi pri takšnih testnih pogojih ni mutagena za izbrani testni organizem (Koivusalo in Vartiainen, 1995). Seva TA97 in TA98 zaznavata mutagene snovi, ki so sposobne indukcije premika bralnega okvirja v histidinskem genu in tako spremenijo mutanto nazaj v divji tip. Takšne snovi so npr. nitroareni, aromatski amini in žveplo vsebujoče heterociklične spojine. Sev TA100 pa zaznava mutagene snovi, ki so sposobne zamenjave baz (GC para) v mutiranem genu. Mnoge mutagene snovi pa imajo sposobnost indukcije revertant obeh sevov (Chen in White, 2004).

Kljub temu, da analizirani fizikalno-kemijski parametri vzorcev jezerskih voda v našem primeru niso presegali mejnih vrednosti, smo s testom Ames v vzorcu 3 zaznali prisotnost snovi, ki za mutageno delovanje potrebujejo bioaktivacijo, v vzorcu 2 pa tudi tiste, ki so direktno mutagene. Vzorca 2 in 3 se od ostalih dveh razlikujeta po večji vsebnosti nitratnega dušika in nekaterih težkih kovin, ki bi eventualno lahko bili induktorji mutacij, vsebujeta pa tudi večje količine klorida, kalcija in natrija (pregl. 1). Številni avtorji poročajo, da je zaradi kombiniranja sestavin v vzorcu (npr. sinergizma in antagonizma) izredno težko določiti povezave med vsebnostjo posameznih onesnaževal v vzorcu in rezultati testov (geno)toksičnosti (Bekaert in

sod., 1999). V vodnih vzorcih pogosto zaznamo težke kovine, PAH, PCB ali pesticide, vendar vsebnosti teh kemikalij pogosto ne korelirajo z ocenjeno (geno)toksičnostjo vzorca (Ohe in sod., 2004). Prav tako številna so poročila, kjer rezultati fizikalno-kemijskih analiz ne zaznavajo (geno)toksičnih snovi, vendar preiskovani vzorci vseeno izražajo (geno)toksične učinke (Maron in Ames, 1983; Donnelly in sod., 1995).

S kometnim testom z migetalkarjem *T. thermophila* za noben vzorec jezerske vode nismo dokazali genotoksičnega potenciala, saj stopnja poškodb DNA, ki so jih povzročili vzorci jezerske vode ni bila statistično značilno večja kot pri negativni kontroli. Rezultate kometnega testa prikazuje slika 1.

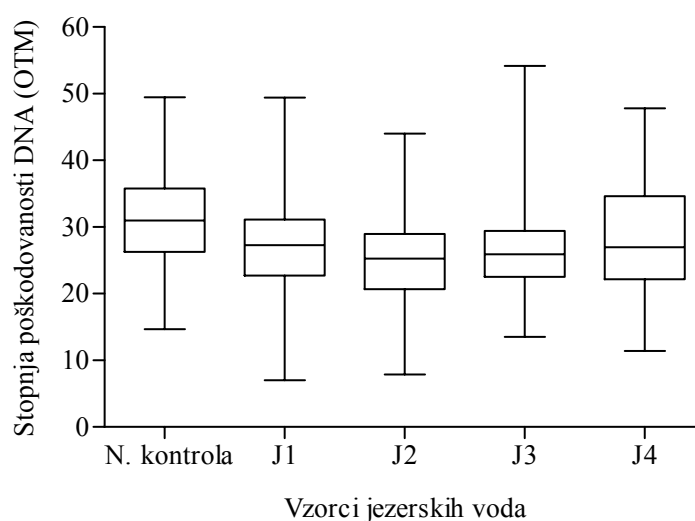


Figure 1. Nuclear DNA damage in *T. thermophila* treated with lake water samples represented as OTM (Olive tail moment). Results from 100 comets for each water sample are shown as box-and-whiskers plots. 50 % of the OTM data are included in the boxes. The inner lines mark the median values and the top and bottom whiskers represent 25th and 75th percentiles.

Slika 1. Poškodbe jedrne DNA na celicah *T. thermophila*, izražene z OTM (repni moment po Olivu) po izpostavitvi vzorcem jezerske vode. Rezultati 100 ocenjenih celic so prikazani v grafikonu z okvirji z ročaji. Okvirji obsegajo 50 % vrednosti OTM. Vmesne meje predstavljajo mediane, zgornji in spodnji ročaji pa 25. in 75. percentile.

Stopnje poškodb DNA, ki so jih povzročili vzorci jezerskih voda, so bile celo manjše, kot pri negativni kontroli. Idealna negativna kontrola, 'kontrolna jezerske vode', bi namreč morala vsebovati vse sestavine jezerske vode, z izjemo genotoksičnih sestavin. Sestavine, ki so v manjših količinah lahko prisotne v jezerski vodi (mikroelementi...), bi na testni organizem lahko delovale celo zaščitno in zmanjšale genotoksični odziv. Bekaert in sod. (2002) poročajo, da je ocena onesnaženosti okolja v filtriranih izlužkih vzorcev zemlje lahko podcenjena. Na podlagi takih poročil lahko predvidevamo, da je filtracija vzorcev lahko vplivala tudi na podcenitev genotoksičnega vpliva vzorcev jezerske vode v našem primeru.

V številnih ekotoksikoloških študijah se je test Ames izkazal za manj občutljivega kot kometni test (Musatova in sod., 1999; Lah in sod., 2005), kar se v naši raziskavi ni pokazalo. Predvidevamo, da so v vzorcih jezerskih voda Šaleške doline prisotne snovi, ki delujejo mutageno, ne povzročajo pa enoverižnih prelomov DNA, ki jih sledimo z alkalno različico kometnega testa.

Rezultati biotestov toksičnosti in genotoksičnosti običajno niso direktno primerljivi. Ker imajo snovi, ki delujejo toksično v organizmih drugačna prijemališča kot genotoksične snovi,

imajo določene substance lahko samo toksični učinek in ne genotoksičnega ter obratno (Chroust in sod., 2006). Toksične snovi največkrat posegajo v delovanje celičnega metabolizma, na encimatskem ali hormonalnem (Hill in sod., 2002) nivoju oz. preko mehanizmov oksidativnega stresa (Hoffman, 2002). Genotoksične učinkovine najpogosteje povzročajo poškodbe DNA ali/in inhibirajo samopopravljalne mehanizme DNA (Bertin in Averbeck, 2006). V naši raziskavi nismo dokazali toksičnega potenciala jezerskih voda v Šaleški dolini, dokazali pa smo mutageni potencial v dveh vzorcih. Zanesljivost teh rezultatov pa je potrebno potrditi z uporabo večjega števila biotestov z organizmi ali celicami na različnih trofičnih nivojih.

V ekotoksikoloških raziskavah želimo pridobiti širši vpogled na dogajanja v okolju. Celostni pristop do problematike lahko dosežemo le s kombiniranjem fizikalno-kemijskih analiz z dobro izbranim naborom biotestov. Če z biotestom potrdimo škodljive učinke okolja, lahko glede na karakteristike danega okolja in študije poti in načinov prenosa onesnaževal v ekosistemu s fizikalno-kemijskimi analizami identificiramo in kvantificiramo znane in tudi potencialno (geno)toksične snovi.

SKLEPI

Za celovitejši pregled mehanizmov in intenzivnosti vpliva okolja na organizme je rezultate uveljavljenih metod fizikalno-kemijskih analiz potrebno dopolniti še z biološkim testiranjem toksičnosti in genotoksičnosti.

Pred dokončno oceno biološke relevantnosti izbranega nabora biotestov za vrednotenje vzorcev površinskih voda, bi bilo v nadaljnjih preučevanjih obravnavanih vzorcev potrebno preizkusiti več različnih biotestov toksičnosti s testnimi organizmi različnih taksonomskih nivojev in različnimi končnimi odzivi.

Vse v tej raziskavi uporabljene bioteste za toksičnost in genotoksičnost bi bilo potrebno tako prilagoditi, da bi lahko testirali nefiltrirane vzorce jezerskih vod. Predvidevamo, da bi bili rezultati v takem primeru lahko drugačni in bolj zanesljivi.

SUMMARY

Every day thousands of chemical compounds are released into the atmosphere, land and water bodies. Thus numerous contaminants, especially xenobiotics, can eventually be found found in surface waters and sediments. Some include toxic, genotoxic compounds or/and potent carcinogens. These hazardous components and their degradation metabolites affect aquatic and soil ecosystems and ultimately human health.

Coal and lignite-mining and their use for heating, industry, nearby thermal power plant and lead smelter, traffic and agriculture have all left severe ecological consequences in Slovenian industrial region of Šalek valley. Physicochemical analyses of four lake water samples have been supplemented with a battery of selected biotests. A commercial toxicity screening test Thamnotoxkit FTM, which includes a freshwater crustacean *Thamnocephalus platyurus* and two genotoxicity determination tests, a standard Ames plate incorporation test with *Salmonella typhimurium* TA97, TA98 and TA100 strains and the comet assay with the ciliate *Tetrahymena thermophila* have been performed.

The results of physicochemical analyses showed no positive deviation from the limit values of Slovenian Decree on the chemical status of surface waters. Also the results of the Thamnotoxkit FTM and the comet assay showed no genotoxic activity. The results of the Ames test confirmed the mutagenic potential of lake water samples 2 and 3 (both from lake of Velenje).

The suggested biotest battery has to be further extended and examined before a conclusion of its biological relevance toward surface water ecotoxicity can be drawn.

VIRI

- Bertin, G./ Averbeck, D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88(2006), 1549–1559.
- Bekaert, C./ Rast, C./ Ferrier, V./ Bispo, A./ Jourdain, M.J./ Vasseur, P. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from contaminated soil. *Organic Geochemistry*, 30(1999), 953–962.
- Bekaert, C./ Ferrier, V./ Marty, J./ Pfohl-Leszkowicz, A./ Bispo, A./ Jourdain, M.J./ Jauzein, M./ Lambomez-Michael, L./ Billard, H. Evaluation of toxic and genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils. *Waste Management*, 22(2002), 241–247.
- Chen, G./ White, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. *Mutation research*, 567(2004), 151–225.
- Chroust, K./ Pavlova, M./ Prokop, Z./ Mendel, J./ Božkova, K./ Kubat, Z./ Zajičková V./ Damborsky J./ Quantitative structure–activity relationships for toxicity and genotoxicity of halogenated aliphatic compounds: Wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, 2006, v tisku.
- Derksen, J.G.M. Microbiotests, Possibilities and Limitations. With special reference to (sub)tropical conditions and developing countries. Amsterdam, Aquasense, 2000, 76 str.
- Donnelly, K.C./ Safe S.H./ Randerath, K./ Randerath, E. Bioassays-based risk assessment of complex mixtures. *Journal of hazardous materials*, 14(1995), 341–350.
- EPA Method 550.1, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water by Liquid-Solid Extraction and HPLC with Coupled Ultraviolet and Fluorescence Detection, 1990, 22 str.
- Fendt, K. Ecotoxicological Problems Associated with Contaminated Sites. *Toxicology Letters*, 140–141(2003), 353–365.
- Hach DR/400 Spectrophotometer Handbook, Loveland, 1999.
- Hill, M./ Stabile, C./ Kraig Steffen, L./ Hill A. Toxic effects of endocrine disruptors on freshwater sponges: common developmental abnormalities. *Environmental Pollution*, 117(2002), 295–300.
- Hoffman D.J. Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds. *Aquatic Toxicology*, 57(2002), 11–26.
- Josephy, P.D./ Gruz, P./ Nohmi, T. Recent Advances in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays. *Mutation Research*, 386(1997), 1–23.
- Koivusalo, M./ Vartiainen, T. Drinking water mutagenicity and leukemia lymphomas and cancers of the liver, pancreas and soft tissue. *Archives of Environmental Health*, 50(1995), 269–76.
- Lah, B./ Malovrh, Š./ Narat, M./ Čepeljnik, T./ Marinšek-Logar, R. Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the comet assay. *Environ. toxicol.*, 19(2004), 545–553.
- Lah, B./ Žinko, B./ Narat, M./ Marinšek Logar, R. Monitoring of Genotoxicity in Drinking Water Using *in vitro* Comet Assay and Ames Test. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (2005), 139–146.
- Maron, D.M./ Ames, N.B. Revised methods for the *Salmonella typhimurium* mutagenicity assay. *Mutation Research*, 113(1983), 211–245.
- Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth edition. United States Environmental Protection Agency, 2002, 275 str.
- Musatova, S.A./ Anisimov, V.N./ Andre, V./ Vigreux, C./ Godard, T./ Sichelc F. Effects of melatonin on N-nitroso-N-methylurea-induced carcinogenesis in rats and mutagenesis *in vitro* (Ames test and COMET assay). *Cancer Letters*, 138(1999), 37–44.
- Nieboer, E./ Richardson, D.H.S. The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, 1(1980), 3–26.
- Ohe, T./ Watanabe, T./ Wakabayashi, K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research* 567(2004), 109–149.
- Olive, P.L./ Banáth, J.P./ Durand, R.E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 112(1990), 86–94.
- Program monitoringa kakovosti jezer v letu 2006. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor, Agencija Republike Slovenije za okolje, 2006, 24 str.
- Resolucija o nacionalnem programu varstva okolja 2005–2012, Ur.l. RS št. 2(2006), 3.
- Singh, N.P./ McCoy, M.T./ Tice, R.R./ Schneider, E.L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175(1988), 184–191.
- SIST DIN 38404-6. Nemške standardne metode za preiskavo vode, odpadne vode in usedlin – Fizikalni in fizikalno-kemijski parametri (skupina C) – Določevanje redoks potenciala (C 6), (2000), 10 str.
- SIST DIN 38406-29, Nemške standardne metode za preiskavo vode, odpadne vode in usedlin – Kationi (skupina E) – 29. del: Določevanje 61 elementov z masno spektrometrijo z induktivno sklopljeno plazmo (ICP-MS) (E29), 2000, 25. str.

- SIST EN ISO 10304-2, Kakovost vode – Določevanje raztopljenih anionov z ionsko kromatografijo – 2. del: Določevanje bromida, klorida, nitrata, nitrita, ortofosfata in sulfata v odpadni vodi. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1998, 21 str.
- SIST EN ISO 17993, Kakovost vode – Določevanje 15 policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAH) v vodi s tehniko HPLC s fluorescenčno detekcijo po ekstrakciji tekoče-tekoče. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2004, 23 str.
- SIST EN ISO 6878, Kakovost vode – Določevanje fosforja – Spektrometrijska metoda z amonijevim molibdatom. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, (2004), 23 str.
- SIST EN ISO 7027, Kakovost vode - Ugotavljanje motnosti. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 10 str.
- SIST ISO 10381-6. Kakovost tal - Vzorčenje - 6. del. Navodilo za zbiranje, ravnanje in hranjenje tal za oceno aerobnih mikrobioloških procesov v laboratoriju. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1993, 4 str.
- SIST ISO 10523, Kakovost vode - Določanje pH. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1996, 10 str.
- SIST ISO 11464. Kakovost tal – Priprava vzorcev za fizikalno-kemijske analize. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 1994, 11 str.
- SIST ISO 5666, Kakovost vode – Določevanje živega srebra. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 16 str.
- SIST ISO 7980, Kakovost vode - Določevanje kalcija in magnezija - Atomska absorpcijska spektrometrijska metoda. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 5 str.
- SIST ISO 8245, Kakovost vode – Smernice za določevanje celotnega organskega ogljika (TOC) in raztopljenega organskega ogljika (DOC). Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 11 str.
- SIST ISO 9964-1, Kakovost vode – Določevanje natrija in kalija – 1. del: Določevanje natrija z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 4 str.
- SIST ISO 9964-2 Kakovost vode – Določevanje natrija in kalija – 2. del: Določevanje kalija z atomsko absorpcijsko spektrometrijo. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 4 str.
- SIST ISO 9964-3, Kakovost vode – Določevanje natrija in kalija – 3. del: Določevanje natrija in kalija s plamensko atomsko spektrometrijo. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2000, 5 str.
- Schultz, T.W. Tetratox: *Tetrahymena pyriformis* population growth impairment endpoint-a surrogate for fish lethality. *Toxicology Methods*, 7(1997), 289–309.
- Stark, J.D./ Banks, E.J. Population Level Effects of Pesticides and other Toxicants on Arthropods. *Annual Review of Entomology*, 48(2003), 505–519.
- Šalej, M. Odnos prebivalcev obremenjenih območij do okolja in okoljskih problemov na vzorčnih primerih Šaleške doline in Zasavja. Velenje. ERICo Velenje, Inštitut za ekološke raziskave. Dela, 18(2002), 378–399.
- Uredba o kemijskem stanju površinskih voda. Ur.l. RS št. 11(2002), 461.
- Verde, P.E./ Geracitano, L.A./ Amado, L.L./ Rosa, C.E./ Bianchini, A./ Monserrat, J.M. Application of public-domain statistical analysis software for evaluation and comparison of comet assay data. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604(2006), 71-82.
- Willemsen, A./ Vaal, M.A./ de Zwart, D. Microbiotests as tools for environmental monitoring. Bilthoven, National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), 1995, 39 str.
- White, P.A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. *Mutation Research*, 515(2002), 85–98.
- Zang, Y./ Zhong, Y./ Luo, Y./ Kong, Z.M. Genotoxicity of Two Novel Pesticides for the Earthworm *Eisenia fatida*. *Environmental Pollution*, 108(2000), 271–278.

EVALUATION OF ETHIOPIAN ISOLATES OF *Pseudomonas fluorescens* AS BIOCONTROL AGENT AGAINST POTATO BACTERIAL WILT CAUSED BY *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*

Henok KUARABACHEW^{a)}, Fasil ASSEFA^{b)} and Yaynu HISKIAS^{c)}

^{a)} Ethiopian Agricultural Research Organization, P.O.BOX 2003, Addis Ababa, Ethiopia.

^{b)} Addis Ababa Univ., Dept. of Biology, P.O.BOX 1176, Addis Ababa, Ethiopia.

^{c)} Institute of Biodiversity Conservation, P.O.BOX 30726, Addis Ababa, Ethiopia.

Received September 04, 2007, accepted December 03, 2007.

Delo je prispelo 04. septembra 2007, sprejeto 03. decembra 2007.

ABSTRACT

A total of 50 fluorescent pseudomonas were collected from different potato growing areas in Ethiopia isolated and characterized, and evaluated on king's B medium for their antibiosis towards *Ralstonia solanacearum* the pathogen of bacterial wilt of potato. Out of the 50 isolates only three i.e., Pf S2, Pf Wt3 and PfW1 showed inhibition against the growth of the pathogen. To test their antagonistic effect under greenhouse condition an experiment was conducted using sterilized soil. Tubers of bacterial wilt susceptible potato clone CIP 383031.15 were used. The potato tubers were dipped into 48 hrs old culture suspension of the three isolates i.e., Pf S2, Pf Wt3, PfW1 and Pfri (Indian reference strain) for 1 hr and planted in pots containing sterilized soil. Bacterization of tubers with isolates Pf S2, Pf Wt3, and PfW1, significantly reduced by 59.83% the incidence of bacterial wilt compared to the pathogen-inoculated control and increased plant growth (plant height and dry weight) by 59.83%, 76.89% and 28.44%, respectively. This suggests the importance of the studied isolates as plant growth-promoting rhizobacteria.

Key words: microbiology / biocontrol / *Pseudomonas fluorescens* / *Ralstonia solanacearum* / potatoes / potato bacterial wilt

OCENA ETIOPSKIH IZOLATOV *Pseudomonas fluorescens* KOT SREDSTVA ZA BIOLOŠKO ZATIRANJE KROMPIRJEVE OVELOSTI, KI JO POVZROČA *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*

IZVLEČEK

Zbrali in opisali smo 50 fluorescentnih pseudomonad z različnih področij v Etiopiji, kjer pridelujejo krompir in na KB gojišču ocenili njihov antibiotični učinek na povzročitelja krompirjeve ovelosti, *Ralstonia solanacearum*. Od 50 izolatov so samo trije, Pf S2, Pf Wt3 in PfW1 inhibirali rast patogena. Da bi ocenili njihovo agonistično delovanje pod pogoji v rastlinjaku, smo naredili poskus s sterilizirano zemljo. Uporabili smo gomolje na ovelost občutljivega klona krompirja CIP 383031.15. Krompirjeve gomolje smo potopili v 48 ur staro kulturo treh izolatov Pf S2, Pf Wt3, PfW1 in Pfri (indijski referenčni sev) za eno uro in posadili v lončke s sterilno zemljo. Okužba gomoljev z izolati Pf S2, Pf Wt3 in PfW1 je značilno znižala pogostnost bakterijske ovelosti za 59,83 % v primerjavi s kontrolno okuženimi rastlinami in izboljšala rast rastlin (višina rastlin in suha snov) za 59,83 %, 76,89 % oziroma 28,44 %. To nakazuje pomen proučevanih izolatov kot rast spodbujajočih rizobakterij.

Ključne besede: mikrobiologija / biološka kontrola / *Pseudomonas fluorescens* / *Ralstonia solanacearum* / krompir / krompirjeva ovelost

INTRODUCTION

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth major crop of the world (CIP, 1984) after rice, wheat and maize. It is an excellent food source in which the tuber provides high energy and quality protein as well as substantial amount of vitamins and minerals.

Potato was first introduced to Ethiopia in 1858 (Pankhurst, 1964) since its introduction, potato production has increased faster than any other food crops covering 50,000 ha (Berga, 1986). However, the yield per unit area is very low compared to those of other countries like Rwanda, Egypt and Kenya. There are many factors that reduce the yield of the crop among which the diseases like late blight (*Phytophthora infestans*), bacterial wilt and viruses play an important role (Yaynu, 1989; Ketema, 1999). Stewart (1956) reported bacterial wilt in areas around Jimma in the western part of the country.

Bacterial wilt also known as brown rot is caused by *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* E.F Smith, a soil-borne bacterial species. It is one of the most destructive plant diseases, which is predominantly distributed in the tropical, subtropical and warm temperate regions of the world (Hayward, 1995). It affects as many as 200 plant species representing more than 50 families of particularly members of solanaeaceous plants such as potato, tomato, eggplant, pepper and tobacco. For example, it is responsible for yield loss of potato to the extent of 50–80% in Kenya, Burundi and Uganda (Ajanga, 1993) and also up to 70% in India (Sinha, 1986). In Ethiopia, the yield loss caused by the disease is not yet determined, but it occurs in potato growing areas of the country at higher incidences and studies regarding the diversity of the pathogen showed that the strains belong to race 3 of biovar 2 of *R. solanacearum* (Yaynu, 1989; Ketema, 1999).

The common control measures employed in other countries include the use of resistant variety, crop sanitation, crop rotation, selection of disease free planting material and other cultural practices as single or integrated disease management. However, control through the use of resistant varieties alone has showed little success. This is because such kind of resistance is strain specific and liable to break down by virulent and highly polymorphic strains of *R. solanacearum* at an ambient temperature and in nematode infested soil (Prior *et al.*, 1994). Successful control of the pathogen through crop rotation is also not always effective since rotation practices recommended for one area may not perform well at other locations in addition to differences in the strains involved (Prior *et al.*, 1994).

The use of rhizosphere resident microbial antagonist specifically the fluorescent pseudomonas is noted as a promising control method. The rhizosphere is a habitat in which several biologically important processes and interactions takes place which is primarily due to the influx of mineral nutrients from accumulation of plant roots exudates from plant roots through mass flow and diffusion (Sorensen, 1997; Bias, 2004). Among the rhizosphere organisms fluorescent pseudomonas strains are often selected for biological control strategies because of their ability to utilize varied substrates under different conditions, short generation time and motility that assist colonization of roots. Moreover, they produce active extracellular compounds such as siderophores responsible for the biological suppression of several soil borne plant pathogens (Bagnasco *et al.*, 1998).

Sunaina *et al.*, (1997) reported that fluorescent pseudomonas strains when applied to potato seed tubers were found to reduce the population of *Eriwinia cartovora* on roots and tubers by 95–100% and 28–95%, respectively. In related study, Gamliel and Katan (1993) found that inoculation of fluorescent pseudomonas decreased the incidence disease caused by *Sclerotium rolfsii* in bean and *Fusarium* wilt in cotton and tomato. Therefore, this study was initiated to screen or evaluate the antagonistic effect of isolates of *P.fluoresecens* against *R.solanacearum* under laboratory and greenhouse condition.

MATERIAL AND METHODS

Collection of *P. fluorescens*

Soil samples were collected from potato growing areas around Wolyata, Shahamane and Wonodogenet and then *P. fluorescens* were isolated following the method of Vlassak, *et al.*, (1992). 1 g of each soil sample was mixed by shaking for 2 h on a rotary shaker at 200 rpm in 100 ml of phosphate buffered saline (PBS). PBS diluted extracts were then plated on King's B (KB) medium which were made selective for isolation of *P. fluorescens* by adding cyclohexamide ($100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$), chloroamphenicol ($13\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) and ampicillin ($50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) (Simon and Ridge, 1974). After incubation at 28 °C for 24 hr representative types of colonies were further purified on KB agar medium and pure isolates will be preserved on KB slant and stored at 4 °C.

Morphological and biochemical characterization of isolates

The following morphological features: colony type, bacterial shape and gram reaction of the isolates were determined using King's B agar medium. Oxidase, catalase; and starch hydrolysis and levan formation test were tested on media supplemented with 0.2% starch and 5% sucrose was done following the method of Goszczynska *et al.* (2000).

Fluorescin production, gelatin liquefaction, salt tolerance, and siderophore detection and carbohydrate utilization tests were performed following the methods of Goszczynska *et al.* (2000), Arnow (1937) and Pickett *et al.* (1991).

In vitro inhibition test

All isolates of *P. fluorescens* were first screened for their toxicity toward the pathogen on KB agar plates in dual culture assays (Ganesan and Gnanamanickam, 1987). KB plates were prepared by mixing suspension of cells scraped from 48–72 hours old culture of the pathogen with cooled and molten KB agar (42 °C). The agar suspension was then dispensed into Petri dishes and was spot inoculated with the test strain from a 24 hours old culture (Skathivel and Gnanamanickam, 1987). Like wise, KB agar plate spot inoculated with sterile water were used as a control. Assay plates were maintained at 28 °C and observed for inhibition zones after 2 to 3 days.

The bacterial designation of isolates of *P. fluorescens* used in this study is described as follows

Pfs: refers to isolates of *P. fluorescens* from Shashamane area

Pfwt: refers to isolates of *P. fluorescens* from Wondogenet area

Pfw: refers to isolates of *P. fluorescens* from Wolayta area

Pfb: refers to isolates of *P. fluorescens* from Bako area

Pfa: refers to isolates of *P. fluorescens* from Ambo area

Pfri: refers to reference strain of *P. fluorescens* from India

Rs262-b: refers to *R. solanacearum* (pathogenic isolate) kindly provided by Ambo Plant Protection Research Center.

Tobacco hypersensitivity reaction (hr)

Since there is a possibility that *R. solanacearum* may lose its virulence and become avirulent upon storage, a preliminary pathogenicity and hypersensitivity test was done to confirm its virulence and race 3 strain of *R. solanacearum*. The pathogenic isolate Rs 262-b obtained from

Ambo Plant Protection Research Center was injected on tobacco leaves following the method of Lazano and Sequeria (1970).

Pathogenicity test

Potato tubers of the susceptible cv, CIP 383032.15 obtained from Holleta Agricultural Research Center (HARC), were planted in 20 cm diameter plastic pots (one plant per pot) filled with sterilized soil. At three-leaf stage potato plants were inoculated following stem puncture method of Winsted and Kelman (1952). Control plants were injected with sterile distilled water. After inoculation the plants were put in an incubator at a temperature of 28 °C for 48 hours and then transferred to green house where the minimum and maximum temperature was 14.8 °C and 35.2 °C, respectively.

Greenhouse experiment

The greenhouse experiment was conducted at the National Soil Research Center, in Addis Ababa with a minimum and maximum temperature of 19–25 °C and 25–31 °C, respectively. Based on the efficiency of *in vitro* antibiosis result, three isolates of *P. fluorescens* were chosen for this experiment. The three selected isolates Pfw 3, Pfw 1, Pfs 2 and Pfri (one reference strain introduced from India) were grown on KB agar medium for 24 hours and diluted to give a suspension, which was adjusted optically to concentration of 10^9 cfu ml⁻¹ (OD₆₀₀ = 1.0) (Mulya *et al.*, 1996). Potato tuber (CV CIP 383032.15) which was highly susceptible to bacterial wilt, was surface sterilized with disinfectants before treatment. The soil was autoclaved at 121 °C for one hour and amended with fertilizer (N : P : K = 2 : 1 : 1) (Mulya *et al.*, 1996) at a rate of 10 g per pot as a solution. Three kilogram sterilized soil were filled into the plastic pots with a diameter of 20 cm, which were surface sterilized with alcohol into which two potato tubers were planted with the following treatment.

Treatments applied were:

- T1. Rs 262-b (pathogen inoculated)
- T2. Pfw 1 treated (Wolayta isolate)
- T3. Pfs 2 treated (Shashamane isolate)
- T4. Pfw 3 treated (Wondogenet isolate)
- T5. Pfri treated (Indian reference strain)
- T6. Pfw 1 treated and Rs 262-b inoculated
- T7. Pfs 2 treated and Rs 262-b inoculated
- T8. Pfw 3 treated and Rs 262-b inoculated
- T9. Pfri treated and Rs 262-b inoculated
- T10. Control (Neither treated nor inoculated)

Potato tuber in T1 was planted in soil infested with 100 ml of 10^9 cfu ml⁻¹ suspension of the pathogen (Sunaina *et al.*, 1997), while in T2 to T5 each tuber was dipped in the suspension of each antagonist isolates for 60 minutes and planted in sterilized soil. But in T6 to T9 after dipping the potato tuber in each suspension for 60 minutes they were planted in sterilized but pathogen inoculated (infested) soil. And potato tuber in T10 was used as control.

Plants were watered regularly with deionized water and treatments were arranged in a completely randomized design with three replication. Observation on percent survival and plant height was taken. Then, the plants were cut at the soil level and dry weights of the shoot were determined after oven drying at 60 °C for 72 hrs.

The experimental data was analyzed using one-way analysis of variance and comparison of means at 5% level was made by Tukey's test. Statistical analysis was done using SPSS v12.0 (SPSS Inc., Chichago, IL. USA).

RESULTS

Isolation and characterization of isolates

A total of 50 fluorescent bacteria isolates were isolated from soil samples collected from different potato growing regions of the country. All isolates produced yellow-green diffusible pigment of variable intensities on King's B medium. Morphologically, they were short rods and form levan on NA with 5% sucrose, which was white, doomed, and mucoid shining colony (Table 1).

Table 1. Distribution of isolates of *P. fluorescens* in different potato growing areas and their cultural characteristics

Preglednica 1. Geografska distribucija izolatov *P. fluorescens* in njihove značilnosti

Origin	No. of isolates	Characteristics			
		Morphology	Colony appearance	Fluorescein production	Levan formation
Shashamanae	10	short rods	small shiny	+	+
Wondogenet	10	short rods	small shiny	+	+
Wolayta	15	short rods	small shiny	+	+
Ambo	8	short rods	small shiny	+	±
Bako	7	short rods	small shiny	+	±

Key: +=Positive reaction; ±=Intermediate reaction

Table 2. Carbohydrate utilization by selected isolates of *P. fluorescens*

Preglednica 2. Izkoriščanje ogljikovih hidratov različnih izolatov *P. fluorescens*

	Carbon source utilization				
	Pfa	Pfb	Pfs	Pfws	Pfw
Arabinose	+	±	+	+	+
Galactose	±	+	+	±	+
Glucose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Mannose	+	±	+	±	+
Trehalose	+	+	+	+	+

Key: +=positive reaction; – = negative reaction; ±=Intermediate reaction

Table 3. Distinctive feature of *R. solanacearum* and *P. fluorescens*

Preglednica 3. Značilne razlike med *R. solanacearum* in *P. fluorescens*

Microorganism	Hypersensitivity reaction	Pathogenicity test	Siderophore production	Antibiotic production
<i>R. solanacearum</i>	+	+	–	–
<i>P. fluorescens</i>	ND	ND	+	+(–)

Key: += positive reaction; – = negative reaction; ND = Not Done

Biochemical properties of the isolates are presented in Table 3 All the isolates were found to be gram negative, oxidase and catalase positive. They were able to grow at 4 °C but not at 41 °C and tolerated NaCl concentration from 1 to 2% but not at 5%. They utilized the tested carbohydrates and produced yellow color on the medium, which was an indication of the utilization of each carbohydrate. In addition they liquefied gelatine but failed to hydrolyze starch. They also produced catechol type siderophore.

Table 4. Morphological and biochemical characteristics of *P. fluorescens* isolates
Preglednica 4 Morfološke in biokemijske lastnosti izolatov *P. fluorescens*

	Characteristics of isolates				
	Pfa	Pfb	Pfs	Pfws	Pfw
Gram reaction	–	–	–	–	–
Colony morphology	S& R	S &R	S&R	S&R	S&R
Pigment production	+	+	+	+	+
Bacterial shape	RS	RS	RS	RS	RS
Oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	–	–	–	–	–
Gelatin liquefaction	±	±	+	+	+
Salt Tolerance					
1% NaCl	+	+	+	+	+
2% NaCl	+	+	+	+	+
3% NaCl	–	–	–	–	–
Growth at 40C	+	+	+	+	+
Growth at 410C	–	–	–	–	–
Siderophore detection	+	+	+	+	+
Levan formation	+	+	+	±	±

Key: + = positive reaction; – = negative reaction; ± = Intermediate reaction, S R = Smooth & round, RS = Rod shaped

Hypersensitivity reaction

Injection of bacterial suspension of Rs 262-b isolate into tobacco leaves caused yellow necrosis with in 24 to 48 hours. There was no progress of necrosis to the adjoining tissues and wilting of the plant even after some weeks showing hypersensitive reaction. In addition, the control plant injected with distilled water remained symptom less.

Pathogenicity test

The result of the pathogenicity test showed that, the bacterial isolate was pathogenic to potato. Development of wilt on the potato plant was rapid and complete wilting of the plant occurred within 8 to 13 days. Infected potato plants exhibited epinasty, stunting and browning of stems upon dissection.

In vitro antibiosis

Out of the 50 fluorescent isolates screened against *P. solanacearum* on KB medium only three local isolates i.e., Pfw 3 (Wondogenet), Pfw 1 (Wolayta), Pfs 1 (Shashamane) and Pfr i (reference strain) were capable of inhibiting the growth of the pathogen while others did not produce any antibiosis. The diameter of inhibition zones ranged from 1.2 to 2.4 cm where the minimum and maximum inhibition caused by *Pfri* and *Pfw1*, respectively table 1. The isolate Pfw 1 from Wolayta and Pfs 2 from Shashamane produced higher zones of inhibition than the rest including the reference strain from India.

Table 5. *In vitro* antibiosis and zones of inhibition caused by *P. fluorescens* isolates on KB medium with *R. solanacearum*

Preglednica 5. *In vitro* antibiotsko delovanje in cone inhibicije, ki jih povzročijo izolati *P. fluorescens* na KB gojišču z *R. solanacearum*

Origin	No. of isolates tested	No. isolates with antibiosis	Name of isolates	Zone of inhibition, cm
Shashamane	10	1	Pfs 2	1.5
Wondogenet	10	1	Pfw 3	1.32
Wolayta	15	1	Pfw 1	2.4
Ambo	8	—	—	—
Bako	7	—	—	—
India	1	1	Pfr i	1.2

Key: + = positive reaction; — = negative reaction

Greenhouse experiment**Bacterial wilt suppression by *P. fluorescens***

Data from the greenhouse experiment showed that only 40% of plants survived in T1 (where potato tuber planted in pathogen infested soil without bacterization). On the other hand, the potato tubers treated with the selected antagonistic isolates prior to planting in pathogen infested soil significantly suppressed the incidence of bacterial wilt and also increased its survival rate by 59.83% as compared to (T1). The control treatment did not show any wilt symptoms and had 100% survival.

Table 6. Suppression of bacterial wilt caused by the pathogen in plant treated with *P. fluorescens*

Preglednica 6. Zatiranje s patogenom povzročene bakterijske ovelosti z obdelavo s *P. fluorescens*

Treatment	Percent survival
T1. Rs262-b ino.	40.0 ^b ± 2.34
T2. Pfw 1 + Rs 262-b	99.89 ^a ± 0.85
T3. Pfs 2 + Rs262-b	99.8 ^a ± 0.84
T4. Pfw 3 + Rs262-b	99.83 ^a ± 1.09
T5. Pfr i + Rs262-b	99.8 ^a ± 1.31
T6. Control	100 ^a ± 1.00

· Numbers are mean and SD of three replicate (two plant in each pot)

* Means followed by the same letter with in a column are not significantly different at $\alpha = 0.05$ by Tukey's test.

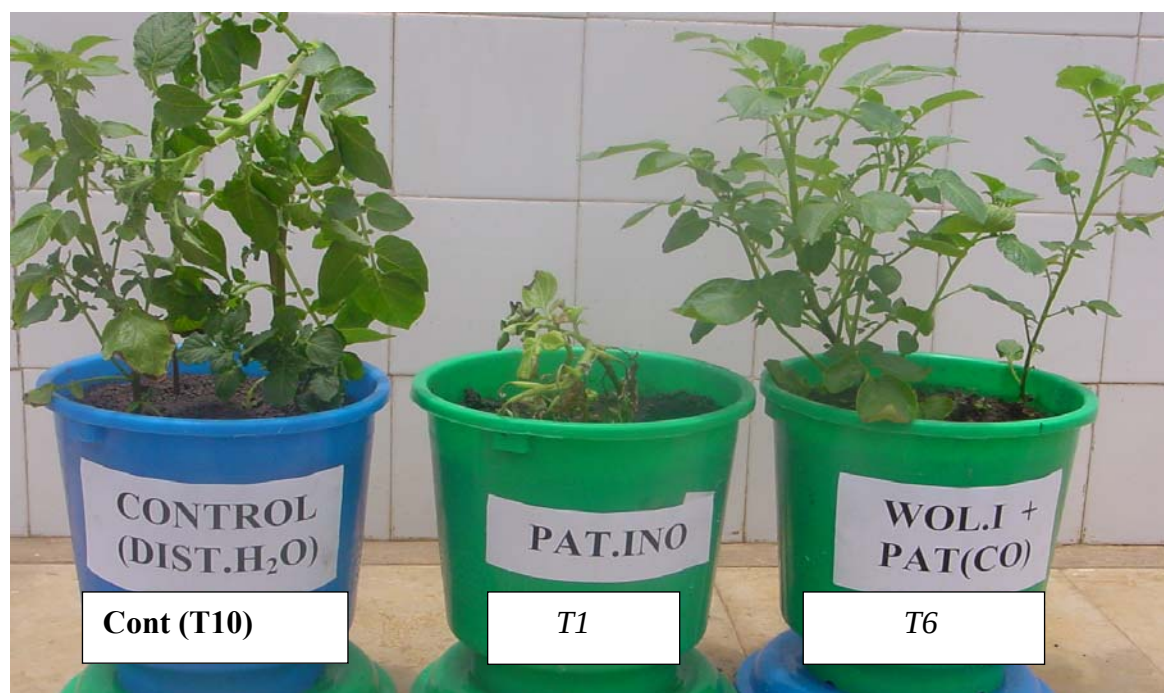


Figure 1. Potato plant showing difference between T1 (pathogen inoculated), T6 (Pfw1 treated and Rs 262-b inoculated) and T10 (non-treated control).

Slika 1. Rastline krompirja, ki kažejo razlike med T1 (inokulirana s patogenom), T6 (tretirana s Pfw1 in okulirana s Rs 262-b) in T10 (netretirana kontrola).

Effect of bacteria treatment on plant height and biomass

Data on plant height and dry weight of potato were recorded in the Table 4. Plant height and biomass were significantly lower in the treatment of pathogen-infested soil (T1) than the rest of all treatment (T2–T10). Potato tuber treated with *P. fluorescens* isolates prior planting in pathogen free (T2–T5) and infested soil increased plant height and dry weight compared to T1. However, *P. fluorescens* treated and pathogen inoculated treatment (T6–T9) do not show an increased plant height and biomass better than the control (T10).

Table 7. Effect of bacterization with isolates of *P. fluorescens* on plant height and biomass

Preglednica 7. Učinek bakterizacije z izolati *P. fluorescens* na višino rastlin in biomaso

Treatment	Height, cm	Dry weight, gm
T1. Rs262-b ino	20.83 ^c ± 2.1	1.9 ^c ± 1.51
T2. Pfw1	32.13 ^a ± 1.1	11.97 ^a ± 2.52
T3. Pfs2	32.87 ^a ± 0.76	11.83 ^a ± 1.19
T4. Pfw3	32.83 ^a ± 1.1	11.7 ^a ± 2.41
T5. Pfir	32.53 ^a ± 0.92	11.53 ^a ± 0.95
T6. Pfw1 + Rs262-b	27.9 ^b ± 1.8	6.77 ^b ± 1.42
T7. Pfs2 + Rs262-b	26.77 ^b ± 1.3	6.67 ^b ± 1.12
T8. Pfw3 + Rs262-b	27.17 ^b ± 1.5	6.67 ^b ± 1.12
T9. Pfi + Rs262-b	26.5 ^b ± 0.87	6.63 ^b ± 1.24
T10. Control	27.4 ^b ± 3.9	6.63 ^b ± 1.5

■ = Numbers are mean and S.D of three replicates (two plant in each pot)

* Means followed by the same letter with in a column are not significantly different by Tukey's test at $\alpha = 0.05\%$.

DISCUSSION

The genus *Pseudomonas* is a very large and important group of non-fermenting, gram negative bacteria, living as saprophytes in soils, sediments and fresh water (Bossis *et al.*, 2000). Some of the species in this genus are already known to improve plant growth and health and are implicated in the natural suppression of certain soils to various soil borne diseases like bacterial wilt of potato, fusarium and verticilium wilt of vegetable crops whereas others are involved in the biodegradation of natural or man made toxic chemical compounds (Bossis *et al.*, 2000).

Biochemical reactions such as fluorescien production, levan formation, certain carbohydrate utilizations and morphological features of the isolates obtained in this study were similar to the result reported by (Palleroni, 1993). The result of oxidase, catalase, starch hydrolysis, gelatine liquefaction, growth temperature, salt tolerance and carbohydrate utilization test were also similar with the characteristics described for the species *P. fluorescens* (Stainer *et al.*, 1966; Bossis *et al.*, 2000). Although the characteristics of *P. fluorescens* were similar with that of *P. putida*, the isolates were further differentiated on the basis of gelatine liquefaction (gelatinase) test, where all isolates of *P. fluorescens* were positive and all isolates of *P. putida* were negative according to Pickett *et al.* (1991).

Similarly, the result of siderophore detection test agreed with result reported by Arnow (1937). The siderophore production is the main property of certain species in the genus *Pseudomonas* that is known to chelate and thereby scavenge the ferric iron. The low ferric iron availability significantly reduces the pathogenesis of organisms in the rhizosphere, especially in iron deficient environment. In this respect this is an adopted and very important biological control strategy (Glick, 1995).

The utilization of different carbohydrate sources except starch by the isolates agreed with result by Palleroni (1993) and revealed the metabolic and ecological diversity of *P. fluorescens*, which presuppose its success of survival and fitness in a new environment and give them a competitive advantage than any other pathogenic organism in a specific niche where it could be applied or treated as biocontrol agent. In addition a variety of microorganisms produce polysaccharide levan which is a homopolysaccharide consisting of 90–100 levan when they grow on sucrose medium. This polysaccharide is known to improve the soil structure i.e., soil aggregation via promotion of porous structure to improve aeration. It also increase soil adhesion to plant root playing a major role in the root colonization stage and provide protection from colonization of the root zone by pathogenic organism which increases its success in ecological competition (Bossis *et al.*, 2000).

The result of the tobacco leaf infiltration test showed that, the pathogen induced chlorosis of the infiltrated tobacco leaf which is the characteristics of race 3 (Marin and El - Nashaar, 1993) but do not cause wilting of the plant. In this respect, the tobacco was shown not to be the host of the isolate belonging to race 3 strain of *R. solanacearum*. On the other hand, the pathogen caused wilting of the potato plant with in 3 to 6 days after inoculation showing the virulent nature of isolate Rs 262-b.

In the *In vitro* antibiosis the smallest and largest inhibition zone of 1.2 and 2.4 cm diameter were caused by Pfri (Indian isolates) and Pfw1 (Wolayta isolates), respectively. Pfw1 have 200% efficiency being the most efficient isolates followed by Pfs2 and Pfw3 with 125% and 111% efficiency, respectively. Similarly, (Savithiry and Gnanamanickam, 1987) and (Anuratha and Gnanamanickam, 1990) obtained 2.5 to 4cm and 1.0 to 2.8 cm inhibition zones on KB agar medium by *P. fluorescens* against *R. solani* and *R. solanacearum* respectively. Therefore, these three isolates along with the Indian reference strain were used as a candidate antagonist for the greenhouse experiment.

The result of greenhouse experiment showed that treatment of potato tuber with selected isolates of fluorescent pseudomonas increased mean survival of potato plant by 59.83%

compared to T1 (Table 6). This suggests a higher level of protection of potato from bacterial wilt and thus the most efficient isolates could be used in biological control of the disease. Similarly, Aspiras and Cruz (1985); Anuratha and Gnanamanikam (1990) and Gamliel and Katan (1993) reported that utilization of antagonistic rhizosphere bacteria such as *Bacillus spp.*, *P. fluorescens* and *P. putida* significantly increased the survival rate of potato, tomato, eggplant and cotton by 60–90%, 90% and 84–90%, respectively against bacterial and fusarium wilt disease.

In the same way, bacterization of tuber with selected efficient isolates (T6–T9) significantly increased the plant height and dry weight by 76.89% and 28.44%, respectively as compared to T1. This result agreed with Sivamari and Gnanamanickam (1988) where they found an increased plant height and biomass of banana seedling by 62.17% and 61.54%, respectively due to bacterization with the suspension of *P. fluorescens* prior to planting in *F. oxysporium f.sp. cubense* infested soil. This is due to the fast growth rate followed by their aggressive root colonization nature that results in displacement of the pathogen and also high competitive and wide metabolic capability of the fluorescent pseudomonas isolates. In addition to siderophore produced by the isolates scavenging Fe (III) and induced systemic resistance, also the specificity between fluorescent pseudomonads and the potato variety may also play a vital role in the wilt suppression and growth promotion of potato (Whips, 2001).

Potato tuber planted after bacterization in treatments T2–T5 showed the most significant growth enhancement (Plant height and dry weight) when compared to potato plant in other treatments. This could be explained on the basis of the possibility of production of growth stimulating substance (hormone), increased nutrient availability in presence of isolates. The results presented in this study suggest the plant growth promoting nature of the bacteria isolated from the soils of Ethiopia according to Glick (1995). Therefore, the evidence presented here is suggestive of the potential of the Ethiopian isolates as biological control agent for bacterial wilt of potato by exploiting the interaction between rhizosphere microorganisms. Plant protection rendered this way can be maximized by combining different methods in an integrated disease management such as resistant variety and biocontrol. Besides the use of specific substrate that enhance selective growth and multiplication of the antagonist, use of multiple microbial inoculant rather than a single species alone, genetic manipulation of the desired isolate (the promising one), improving delivery of the formulation of the biocontrol agent etc, can be considered as untapped potential of *P. fluorescens* in the biological control of potato bacterial wilt in the country.

REFERENCES

- Ajanga, S. Status of bacterial wilt in Kenya. In: *Bacterial wilt*, (Eds.: Hartman, G.L/ Hayward, A.C.). ACIAR proceedings No. 45, Canberra, Australia, 1993, 338–340.
- Anuratha, C.S/ Gnanamanickam, S.S. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. *Plant and soil*, 124(1990), 109–116.
- Arnou, L.E. Colorimetric determination of the component of 3,4 hydroxyphenyl alanine-tyrosine mixtures. *Ann. Rev. Biochem.* 50(1973), 715–731.
- Aspiras, R.B/ De La Cruz, A. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* Fu6 and *Pseudomonas fluorescens*. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific*, (Ed.: Perseley, G.J.). ACIAR proceeding No.13. Canberra, Australia, 1986, 89–92.
- Bagnasco, P./ Fuente, D.L./ Gualtieri, G./ Noya, F./ Arias, A. Fluorescent pseudomonas spp. as Biocontrol agent against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 30(1998), 1317–1372.
- Berga Lemaga The influence of media, age of mother stocks and number of leaves on rooting ability of potato (*Solanum tuberosum* L) stem cuttings. Msc thesis, Alemaya, Ethiopia., 1986, 1–20.
- Bias, H.P. How plant communicate using the under ground information super highway. *Trends in Plant science* 9(2004)2, 26–32.
- Bossis, E./ Lemanceau, P./ Latour, X./ Gardan, L. The taxonomy of *P. fluorescens* and *P. putida*: current status and need for revision. *Agronomie*, 20(2000), 51–63.

- CIP (International potato center). Potatoes for the developing Countries, Lima, Peru. 1984, 150 p.
- Gamliel, A./ Katan, J. Suppression of major and minor pathogen by *fluorescent pseudomonas* in solarized soils. *Phytopathology*, 83(1993), 68–75.
- Ganesan, P./ Gnanamanickam, S.S. Biological control of *Sclerotium rolfsii* sacc in pea nut by inoculation with *P. fluorescens*. *Soil Biol.Biochem*, 19(1987), 35–38.
- Glick, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 41(1995), 109–117.
- Goszczynska, T./ Serfontein, J.J./ Serfontein, S. Introduction to Practical Phytobacteriology. Bacterial disease unit. ARC-Plant Protection Research Institute Pretoria, South Africa, 2000.
- Hayward, A.C. *Pseudomonas solanacearum* pathogens and host specificity in plant disease: Histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. In: *Prokaryotes* (Eds.: Singh, U.S./ Singh, R.P./ Kohmoto, K.). Tarrytown, N.Y., Elsevier Science, Inc., 1995, 139–151.
- Ketema Abebe Bacterial wilt *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* of potato in south and central Ethiopia: distribution, latency and Pathogen characterization. Msc thesis, Addis Ababa Univ., Addis Ababa, Ethiopia, 1999, 83 p.
- Kloepper, J.W./ Leong, J./ Tteintze, M./ Schroth, M.N. *Pseudomonas siderophore*: a mechanism explaining disease suppressive soil. *Curr. Microbiol.*, 4(1980), 317–320.
- Lazano, J.C/ Sequeira, L. Differentiation of races of *Pseudomonas solanacearum* by leaf infiltration technique. *Phytopathology*, 60(1970), 833–838.
- Marin, J.E./ El-Nashaar, N.M. Pathogenicity of new phenotypes of *Pseudomonas solanacearum* from peru. In: *Bacterial wilt.*, z (Hartman, G.L and Hayward, A.C.,eds). Canberra, Australia, ACIAR proceeding No. 45., 1993, 78–84.
- Muylar, K./ Watanabe, M./ Goto, M./ Takikawa, Y./ Tsuyumu, S. Suppression of bacterial wilt disease of tomato by root dipping with *P. fluorescens* pfg 32. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 62(1996), 134–140.
- Palleroni, N.J. *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of gram-negative bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64(1993), 231–251.
- Pankhurst, R. Notes for a history Ethiopian agriculture. *Ethiopian Observer*, (1964)7, 210–240.
- Pankhurst, R. Notes for a history Ethiopian agriculture. *Ethiopian Observer*, (1964)7, 210–240.
- Persello-Cartiaux, F./ Nussaume, L./ Robaglia, C. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. *Plant cell Environ.*, 26(2003), 189–199.
- Pickett, M.J./ Goodneer, J.R./ Harvey, S.M. Test for detecting degradation of gelatin: Comparison of five methods. *J. Clinical Microbiol.*, 29(1991), 2322–2325.
- Prior, P./ Grimault, P.V./ Schmit, J. Resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in tomato: the present status and prospects. In: *Bacterial wilt. The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum* (Eds.: Hayward, A.C./ Hartman, G.L.). CABI, 1994, 209–222.
- Savithiry, S./ Gnanamanickam, S.S. Bacterization of peanut with *P. fluorescens* for biological control of *Rhizoctonia solani* and enhanced yield. *Plant and Soil*, 102(1987), 11–15.
- Simon, A./ Ridge, E.H. The use of ampicillin a simplified selective medium for isolation of fluorescent pseudomonas. *J. Appl. Bacteriol.*, 37(1974), 459–460.
- Sinha, S.K. Bacterial wilt in India. In: *Bacterial wilt disease in Asia and the south pacific* (Ed.: Persely, G.J.). Canberra, Australia, ACIAR proceeding No.13., 1986
- Sivamari, E./ Gnanamanickam, S.S. Biological control of *Fusarium oxysporium f.sp.cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and soil.*, 107(1988), 3–9.
- Skathivel, N./ Gnanamanickam, S.S. Evaluation of *P. fluorescens* for suppression of sheath rot disease and for enhancement of grain yield in rice, *Oriza sativa*. L. *Appl. environ. Microbiol.*, 53(1987), 2036–2059.
- Sorensen, J. The rhizosphere as a habitat for soil microorganisms. In: *Modern microbiology* (Eds.: Elsas, J.D.V./ Trevors, J.T./ Wellington, E.M.H.). New York, 1997, 21–45.
- Stewart, R.B. Some plant disease occurring in Keffa Province, Ethiopia. Ethiopia, College of Agriculture Alemaya, 1956.
- Sunaina, V./ Kishore, V./ Shekhawat, G.S./ Kumar, M. Control of bacterial wilt of potatoes in naturally infested soil by bacterial antagonist. *J. Plant disease and protection*, 104(1997)4, 362–369.
- Vlassak, K./ Holm, L.V./ Duchateau, L./ Vanderleyden, J./ Demot, R.D. (). Isolation and characterization of fluorescent pseudomonas associated with the roots of rice and banana grown in Sirilanka. *Plant and Soil*, 145(1992), 51–63.
- Winstead, N.N./ Kelman, A. Inoculation technique for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 42(1952), 628–634.
- Yaynu Hiskias. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum* in Ethiopia. *Ethiopian Journal of Agricultural science*, 11(1989)1, 7–13.

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 90

Ljubljana, december 2007

Številka 2

SUBJECT INDEX BY AGROVOC DESCRIPTORS

PREDMETNO KAZALO PO DESKRIPTORJIH AGROVOC

Tomaž BARTOL ^{a)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Agronomy Dept., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, Assoc.Prof., Ph.D., M.Sc., e-mail: tomaz.bartol@bf.uni-lj.si.

animal husbandry	97–106	molecular genetics	69–83
behaviour	107–113	optical properties	107–113
bioassays	107–113, 115–124	plant growth stimulants	125–135
biodiversity	97–106	prevotella	107–113
biological control	125–135	pseudomonas fluorescens	125–135
chemicophysical properties	115–124	pseudomonas solanacearum	125–135
domestic animals	97–106	rats	69–83
environmental protection	115–124	regulations	97–106
extracts	85–95	rhizobacteria	125–135
fermentation	85–95	rumen fluid	85–95
genetic markers	69–83	rumen microorganisms	107–113
genetic polymorphism	69–83	sense organs	107–113
genetic variation	69–83	standardizing	97–106
genotoxicity	115–124	starch	85–95
in vitro experimentation	85–95	tannins	85–95
inbred lines	69–83	terminology	97–106
inbreeding	69–83	toxicity	115–124
lakes	115–124	useful animals	97–106
legislation	97–106	water analysis	115–124
livestock	97–106	wild animals	97–106
mice	69–83	wildlife	97–106
microbial flora	107–113	wilts	125–135

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 90

Ljubljana, december 2007

Številka 2

SUBJECT INDEX BY AGRIS CATEGORY CODES

VSEBINSKO KAZALO PO PREDMETNIH KATEGORIJAH AGRIS

Nataša SIARD ^{a)}

^{a)} Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Zootechnical Dept., Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, Ph.D., M.Sc.,
e-mail: natasa.siard@bfro.uni-lj.si.

Crop husbandry – F01: 125–135

Animal husbandry – L01: 97–106

Animal physiology – nutrition – L51: 85–95, 107–113

Nature conservation and land resources – P01: 115–124

Acta agriculturae Slovenica

Letnik 90

Ljubljana, december 2007

Številka 2

ABECEDNO KAZALO AVTORJEV

AUTHOR'S INDEX

Št. No.	Avtor Author	Stran primarnega prispevka Page of the primary source
1.	ASSEFA Fasil	125–135
2.	AVGUŠTIN Gorazd	107–113
3.	BARTOL Tomaž	137
4.	GORENC Gregor	107–113
5.	HISKIAS Yaynu	125–135
6.	HORVAT Simon	69–83
7.	KUARABACHEW Henok	125–135
8.	LAVRENČIČ Andrej	85–95
9.	LUKÁŠ Filip	107–113
10.	MARINŠEK-LOGAR Romana	115–124
11.	OSOJNIK ČRNIVEC Ilja Gasan	115–124
12.	PERŠE Martina	69–83
13.	ROZMAN Damjana	69–83
14.	SIARD Nataša	139
15.	SIVKA Urška	85–95
16.	ŽIGO JONOZOVIČ Aleksandra	97–106

NAVODILA AVTORJEM

Prispevki

Sprejemamo izvirne znanstvene članke, predhodne objave in raziskovalne notice s področja zootehnike (genetika, mikrobiologija, imunologija, prehrana, fiziologija, ekologija, etologija, mlekarstvo, ekonomika, živalska proizvodnja in predelava živalskih proizvodov, tehnologija in dokumentalistika) v slovenskem in angleškem jeziku, znanstveno pregledne članke samo po poprejšnjem dogovoru. Objavljamo tudi prispevke, podane na simpozijih, ki niso bili v celoti objavljeni v zborniku simpozija. Če je prispevek del diplomskega, magistrskega ali doktorskega dela, navedemo to in tudi mentorja na dnu prve strani. Navedbe morajo biti v slovenskem in angleškem jeziku.

Pri prispevkih v slovenskem jeziku morajo biti preglednice, grafikoni, slike in priloge dvojezični, povsod je slovenščina na prvem mestu. Naslovi grafikonov in slik so pod njimi. Slike in grafikoni so v besedilu. Priloženi morajo biti tudi jasno označeni izvirniki slik (fotografije ali ločene grafične datoteke). Na avtorjevo željo jih vračamo. Grafikoni morajo biti črno-beli, brez rastrov. Dovoljeni so vzorci v črno-beli kombinaciji. Latinske izraze pišemo ležeče. V slovenščini uporabljamo decimalno vejico, v angleščini decimalno piko. Prispevki v angleščini morajo imeti povzetek v slovenščini in obratno.

Prispevki naj bodo strnjeni, kratki, največ 12 strani. Uporabljamo Microsoft Word 97 ali novejšo verzijo (Windows); pisava v besedilu in preglednicah je Times New Roman, velikost črk 12, v obsežnih preglednicah je lahko 10, pisava v grafikonih in slikah je Ariel, velikost črk najmanj 9, pisava za primerjave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij je Courier; zunanji rob 2,0 cm, notranji 2,5 cm, zgoraj živa *pagina* v eni vrstici, velikost črk 10 z avtorjem oz. avtorji in naslovom prispevka, zaključenim s piko. Če je naslov daljši, ga smiselno okrajšamo. Primera: Štuhec, I. in Siard, N. Obnašanje prašičev. Stibilj, V. in sod. Določitev maščobno-kislinske sestave ... vzorcev mleka v Sloveniji.

Prva stran

Na prvi strani prispevka na desni strani označimo vrsto prispevka v slovenščini in angleščini, sledi naslov prispevka, pod njim avtorji. Ime avtorjev navedemo v polni obliki (ime in priimek). Vsak avtor naj bo označen z indeksom, ki ga navedemo takoj pod avtorji, in vsebuje polni naslov ustanove ter znanstveni in akademski naslov; vse v jeziku prispevka. Navedemo sedež ustanove, kjer avtor dela. Če je raziskava opravljena drugje, avtor navede tudi sedež te inštitucije. Na željo avtorjev bomo navedli naslov elektronske pošte.

Pod naslovi avtorjev je datum prispetja in datum sprejetja prispevka, ki ostaneta odprta. Sledi razumljiv in poveden izvleček z do 250 besedami. Vsebuje namen in metode dela, rezultate, razpravo in sklepe. Sledijo ključne besede.

Izvlečku v jeziku objave sledi naslov in izvleček s ključnimi besedami v drugem jeziku.

Predlogo za pomoč pri oblikovanju prve strani prispevka najdejo avtorji na domači strani: <http://aas.bfro.uni-lj.si/predloga-aas.dot>.

Viri

V besedilu navajamo v oklepaju avtorja in leto objave: (priimek, leto). Če sta avtorja dva, pišemo: (priimek in priimek, leto), če je avtorjev več, pišemo: (priimek in sod., leto). Sekundarni vir označimo z »navedeno v« ali »cv.«. Seznam virov je na koncu prispevka, neoštevilčen in v abecednem redu. Vire istega avtorja, objavljene v istem letu, razvrstimo kronološko z a, b, c. Primer: 1997a. Navajanje literature naj bo popolno: pri revijah letnik, leto, številka, strani; pri

knjigah kraj, založba, leto, strani. Za naslove revij je dovoljena uradna okrajšava, za okrajšanimi besedami naj bodo vedno pike. Navedbo zaključimo s piko. Nekaj primerov:

Fraser, A.F./ Broom, D.M. Farm animal behaviour and welfare. London, Bailliere Tindall, 1990, 437 str.

Hvelplund, T. Protein evaluation of treated straws. V: Evaluation of straws in ruminant feeding (ur.: Chenost, M./ Reiniger, A.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 66–74.

Stekar, J.M.A. Vsebnost makro elementov v slovenski mrvi. V: Posvetovanje o prehrani domačih živali »Zadravčevi-Erjavčevi dnevi«, Radenci, 1997-10-27/28. Murska Sobota, Živinorejsko-veterinarski zavod za Pomurje, 1997, 105–117.

Stekar, J.M.A./ Golob, A./ Stibilj, V./ Koman Rajšp, M. Sestava in hranilna vrednost voluminozne krme v letu 1990. Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljublj., Kmet. Živin., 58(1991), 149–155.

Stekar, J.M.A./ Pen, A. Sadržaj natriuma, cinka i mangana u stočnoj hrani sa travnatih površina. Agrohemia, 21(1980)1–2, 7–15.

Oddaja

Avtorji prispevke oddajo v dveh izvodih, enega z dvojnimi razmikom med vrsticami in največ 35 vrstic na strani, in na disketi. Priložijo tudi izjavo s podpisami vseh avtorjev, da avtorske pravice v celoti odstopajo reviji.

Prispevke recenziramo in lektoriramo. Praviloma pošljemo mnenje prvemu avtorju, po želji lahko tudi drugače. Če urednik ali recenzenti predlagajo spremembe oz. izboljšave, vrne avtor popravljeno besedilo v 10 dneh v dveh izvodih, enega z dvojnimi razmikom. Ko prvi avtor vnese še lektorjeve pripombe, odda popravljeno besedilo v enem izvodu in na disketi ter vrne izvod z lektorjevimi popravki.

Prispevke sprejemamo vse leto.

NOTES FOR AUTHORS

Papers

We publish original scientific papers, preliminary communications and research statements on the subject of zootechny (genetics, microbiology, immunology, nutrition, physiology, ecology, ethology, dairy science, economics, animal production, technology and information science) in Slovenian and English languages while scientific reviews are published only upon agreement. Reports presented on conferences that were not published entirely in the conference reports can be published. If the paper is a part of diploma thesis, master of science thesis or dissertation, it should be indicated at the bottom of the front page as well as the name of mentor. All notes should be written in Slovenian and English language.

Papers in Slovenian language should have tables, graphs, figures and appendices in both languages, Slovenian language being the first. Titles of graphs and figures are below them. Figures and graphs are part of the text. Clearly marked original figures should be added (photographs or separate graphic files); they can be returned upon request. Latin expressions are written in italics. Decimal coma is used in Slovenian and decimal point in English. Papers in English should contain abstract in Slovenian and *vice versa*.

The papers should be condensed, short and should not exceed 12 pages. Microsoft Word 97 or later version (Windows) should be used, fonts Times New Roman, size 12 in text and tables (in large tables size 10 is allowed), Ariel for graphs and figures (letter size at least 9) and Courier for nucleic- and amino acid sequence alignments should be used; right margin 2.0 cm, left margin 2.5 cm; *pagina viva* in one line, size 10, author(s) and abbreviated title of the paper ending with a full stop. Examples: Štuhec, I. and Siard, N. Pig Behaviour. Stibilj, V. *et al.* Determination of fatty acids composition ... milk samples in Slovenia.

First page

The type of the paper should be indicated on the first page on the right side in Slovenian and English language following by title of the paper and authors. Full names of authors are used (first name and surname). Each name of the author should have been added an index, which is put immediately after the author(s), and contains address of the institution and academic degree of the author, in the language of the paper. The address of the institution in which the author works is indicated. If the research was realised elsewhere, the author should name the headquarters of the institution. E-mail is optional.

Under the address of the authors some space for dates of arrival and acceptance for publishing should be left. A comprehensive and explicit abstract up to 250 words follows indicating the objective and methods of work, results, discussion and conclusions. Key words follow the abstract.

The abstract in the language of the paper is followed by the title, abstract and key words in another language.

Help instructions for first page design can be found on home page:

<http://aas.bfro.uni-lj.si/template-aas.dot>.

References

References should be indicated in the text by giving author's name, with the year of publication in parentheses, e.g. (surname, year). If authors are two, the following form is used: (surname and surname, year). If authors are several, we use (surname *et al.*, year). Secondary literary sources should be quoted in the form "cited in". The references should be listed at the

end of the paper in the alphabetical order and not numbered. If several papers by the same author and from the year are cited, a, b, c, etc. should be put after the year of the publication: e.g. 1997a. The following form of citation is used: for journals volume, year, number, page; for books place of publication, publisher, year, pages. For journals official abbreviated forms can be used. A full stop should be put after the abbreviated words. Each reference is also closed by a full stop. Examples:

- Fliegerová, K./ Pažoutová, S./ Hodrová, B. Molecular genotyping of rumen fungi based on RFLP analysis. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljubl., Kmet. Zooteh.*, 72(1998), 95–98.
- Fraser, A.F./ Broom, D.M. Farm animal behaviour and welfare. London, Bailliere Tindall, 1990, 437 p.
- Hvelplund, T. Protein evaluation of treated straws. In: *Evaluation of straws in ruminant feeding* (Eds.: Chenost, M./ Reiniger, A.). London, Elsevier Applied Science, 1989, 66–74.
- Ristič, M./ Klein, F.W. Schlachtkörperwert von Broilern verschiedener Herkunft. *Mitteilungsblatt der Bundesanstalt fuer Fleischforschung, Kulmbach*, 101(1988), 8045–8051.
- Stekar, J.M.A. Silage effluent and water pollution. In: *6th International Symposium "Animal Sciences Days"*, Portorož, 1998-09-16/18, Slovenia. *Zb. Bioteh. Fak. Univ. Ljubl., Kmet. Supl.*, 30(1998), 321–325.

Delivery

Papers should be delivered in two hard copies, one with double-spacing and not more than 35 lines per page and on a floppy disc. A statement signed by all authors transfers copyrights on the published article to the Journal.

Papers are reviewed and edited. First author receives a review. If reviewers suggest some corrections, the author should forward them in 10 days and in two copies, one of them with double space. After the first author considers the editor's notes, the corrected paper should be sent in one copy and on a floppy disc.

Papers are accepted all year.

Acta agriculturae Slovenica

Issued by	Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana., Slovenia.
Editor-in-Chief	Prof. Peter DOVČ, Ph.D.
Technical Editor	Jože STOPAR
Editor Board	Prof. Tajana ČERNY, Ph.D. (Zagreb), Academician Prof. Remzi BAKALLI, Ph.D., (Athens, ZDA), Prof. Zdenko PUHAN, Ph.D. (Zürich), Michel BONNEAU, Ph.D. (Saint Gilles), Prof. Dr.h.c. Franz PIRCHNER, Ph.D. (Innsbruck), Prof. Jasna M.A. STEKAR, Ph.D. (Ljubljana), Drago BABNIK, Ph.D. (Ljubljana), Prof. Jernej TURK, Ph.D. (Maribor), Assoc.Prof. Dejan ŠKORJANC, Ph.D. (Maribor), Ass.Prof. Slavica GOLC TEGER, Ph.D. (Ljubljana), Assoc.Prof. Milena KOVAČ, Ph.D. (Ljubljana)
Proof Reading	Vanda ŠUŠTERŠIČ
Printed by	ROTOSI d.o.o., Tomačevo 19, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, in 450 copies
Address of Editor	Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenia, Tel.: +386 1 7217 800, Telefaks: +386 1 7241 005
E-mail	peter.dovc@bfro.uni-lj.si
Home page	http://aas.bf.uni-lj.si/index-en.htm
Annual subscription	25,04 EUR, for foreign countries 30 EUR
Individual issue	16,69 EUR, for foreign countries 20 EUR
Account holder	UL, Biotechnical Faculty, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenia
Bank	BANKA SLOVENIJE, Slovenska 35, SI-1505 Ljubljana, Slovenia
Account number	01100-6030707410; reference 40-521-200341
IBAN	SI56011006030707410
SWIFT Code	BSLJSI2x
Subsides by	Slovenian Research Agency
Res. Reports are regularly indexed and abstracted by	AGRIS, CAB Abstracts, COBISS and FSTA
Indexing, Classification and Networking	International: Slovene National AGRIS Center National: INDOC of zootechnics
Please, address exchange publication to	Central Library of the Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana, P.O. Box 2995, Slovenia
Copyright	© 2007 University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department