



# **NOVE METODE SPREMLJANJA STANJA VODA**

► Maša Zupančič

♻️ Čisti vodni viri so življenjskega pomena, zato so številne raziskave usmerjene v izboljšanje načinov spremljanja njihovega stanja. (foto: Maša Zupančič)

Vsi organizmi puščajo v vodi sledi svojega dednega zapisa in ti drobci vsebujejo ključne podatke o ekološkem stanju voda. Zato so prizadevanja raziskovalcev v zadnjem času usmerjena v zbiranje tovrstnih podatkov s pomočjo določanja zaporedja DNK.

♻️ Perniško jezero in ostali zadrževalniki v severovzhodnem delu Slovenije so pogosto podvrženi eutrofikaciji, torej pretiranemu vnosu hranilnih snovi, kar je predvsem posledica intenzivnega kmetijstva. To omogoča prekomerno razraščanje alg in cianobakterij, ki tvorijo goščo na vodni površini. (foto: Tina Eleršek)

**C**ELINSKE VODE predstavljajo le nekaj odstotkov vseh svetovnih voda, vendar njihova vloga nikakor ni zanemarljiva. Prav te vode so namreč eden najdragocenejših naravnih virov na Zemlji, kljub temu pa jih vpliv človeka in njegovih dejavnosti zelo ogroža. Številne površinske vode – vodotoki, jezera in zadrževalniki – so obremenjene s hranili (večinoma gnojili), kmetijskim in industrijskim onesnaževanjem ter odplakami gospodinjstev. Onesnaženju ne more uiti niti podtalnica,

ki je v Sloveniji glavni vir pitne vode.

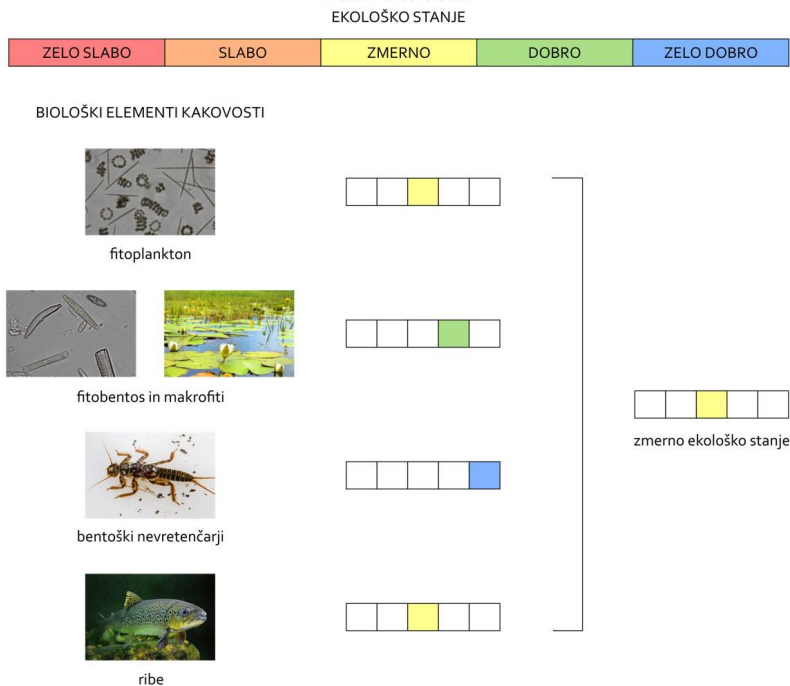
Trajnostno gospodarjenje z vodnimi viri in splošen dostop do vode ter urejene higienske (sanitarne) razmere so med cilji trajnostnega razvoja Organizacije združenih narodov. Kakovostni in čisti vodni viri so predvsem pomembni za zagotavljanje pitne vode, poleg tega pa so ključni tudi za higieno ter zdravstveno oskrbo, nujni pa so tudi v kmetijstvu in industriji ter rekreaciji in turizmu. Pri tem je ključno redno spremljanje njihovega ekološkega in kemijskega stanja, kar omogoča zaznavanje kratkoročnih in dolgoročnih sprememb v okolju. Le tako lahko namreč pravočasno zaznamo morebitno poslabšanje in temu primerno ukrepamo.

#### ► BIOINDIKATORJI

V Sloveniji se, kot v vseh članicah Evropske unije, spremljanje in nadzor stanja voda izvaja v skladu z Evropsko vodno direktivo. Ta dokument iz leta 2000 stremi k doseganju oziroma ohranjanju čistih in kemično neoporečnih voda v vseh



⇒ Poenostavljen prikaz ocenjevanja ekološkega stanja na podlagi štirih bioloških elementov kakovosti. Končno oceno narekuje najslabše ocenjeni element. (prirejeno po [4], viri in avtorji fotografij: Tina Eleršek; Maximillian cabinet, manatus, Kletr / Shutterstock.com)



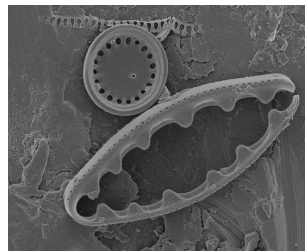
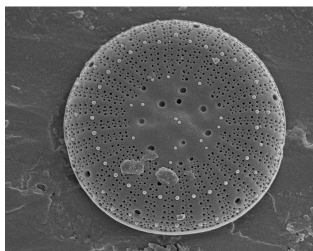
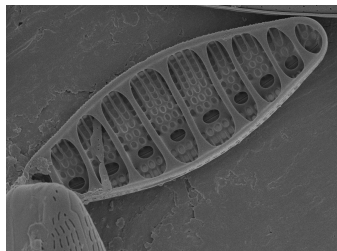
državah članicah. Njihovo kakovost ocenjujemo na podlagi štirih temeljnih značilnosti. Te so fizikalne in kemijske, kot je npr. vsebnost hranil, sestava in značilnosti vodnega okolja (hidromorfologija), npr. vodni režim, ter posebnih vrst onesnaževanja, npr. s pesticidom *glifosat*. Poleg tega spremljamo tudi biološke dejavnike oz. raznolikost živih organizmov in številčnost izbranih vrst.

Nekatere živalske in rastlinske vrste ter mikroorganizme, ki se na določene spremembe v okolju in onesnaženje značilno odzivajo, imenujemo s tujko bioindikatorji. Po slovensko bi jim lahko rekli živa tipala oz. živa zaznavala. Zaradi takšnih lastnosti lahko že po njihovi prisotnosti ali odsotnosti sklepamo na ekološko sliko njihovega življenjskega okolja. Tako npr. žuželke iz reda vrbnic (*Plecoptera*) nakazujejo zelo nizko onesnaženost voda z organskimi odpadki, po-

dobno kot na kopnem nekatere vrste lišajev na drevesnem lubju odražajo visoko kakovost zraka. Po drugi strani pa poznamo tudi organizme, ki kažejo na onesnaževanje. Takšne so npr. določene vrste alg in cianobakterij, ki ob povečanem številu kažejo na visoko vsebnost hranil (eutrofikacijo) voda.

Biološko kakovost voda ocenjujemo s pomočjo proučevanja različnih skupin organizmov oz. bioloških elementov kakovosti. Mednje spadajo alge in cianobakterije, ki lahko lebdiijo v vodi ali živijo v stiku s podlago (fitoplankton ali fitobentos), ter drobne živali na rečnem oz. jezerskem dnu, v nanosih ali na rastlinah (bentoški nevretenčarji). Poleg teh majhnih organizmov proučujemo tudi s prostim očesom vidne rastline (makrofite) in ribe.

S proučevanjem različnih bioloških elementov kakovosti izdelamo več delnih ocen, ki jih nato ob upo-



števanju pomožnih fizikalnih in kemijskih, hidromorfoloških elementov ter vpliva posebnih onesnaževal sestavimo v splošno oceno, pri čemer je odločilna najnižja. Na podlagi dognanega nato proučeno vodno okolje uvrstimo v enega izmed petih razredov kakovosti. Ekološko stanje vodnega okolja je lahko zelo dobro, dobro, zmerno, slabo ali zelo slabo.

Prepoznavanje vrst organizmov temelji na morfoloških znakih ali na značilnostih in zgradbi primerkov, ki jih določamo z opazovanjem s prostim očesom ali pod mikroskopom. Takšni postopki so pogosto zamudni in dragi, točnost pa je v dokajšnji meri odvisna od izkušnosti in osebne presoje raziskovalca. Poleg tega lahko ob tem z določenimi postopki proučevane vrste tudi poškodujemo, kot npr. pri vzorčenju rib z električnim tokom. Razlikovanje med sorodnimi vrstami je še posebej težavno pri fitoplanktonu in fitobentosu, k čemur pripomore pomanjkanje opaznih razlik v zgradbi ter majhnost celic.

### ► DNK KOT TUIJ JEZIK

Kaj pa, če bi lahko postopek določanja vrst in števila organizmov v vzorcu poenostavili in skrajšali ter v njem preprosto prebrali sledi DNK, kot preiskovalci 'preberejo' sledi (npr. prstne odtise) na kraju zločina? S to zamisljajo se ukvarjajo številni raziskovalci. Ti so odkrili, da takšna molekularna analiza omogoča preprostejšo, hitrejšo, zanesljivejšo in cenejše ocenjevanje ekološkega stanja voda. Pristop temelji na določanju vrst organizmov na podlagi branja njihovega dednega zapisa.

Takšna raziskava se prične z nabiranjem vzorcev. Za molekularno analizo potrebujemo vzorec vode ali biofilma, torej skupka mikroorganizmov v stiku s trdno podlago, iz katerega lahko izločimo okoljsko DNK. V vodnem okolju ne manjka življenja, saj tam domujejo številni virusi, bakterije, rastline in živali. Ob tem ne gre pozabiti niti občasnih obiskovalcev, kot smo ljudje ter naši

🔍 Kremenaste alge v fitobentosu so zaradi svoje specifične občutljivosti na številne ekološke pogoje zelo pogosto uporabljene v bioindikaciji. Ime so dobile po kremenastih lupinicah zanimivih oblik, ki jih tvorijo. Na fotografiji so deli lupinic različnih vrst, posneti z elektronskim mikroskopom. (foto: Tina Eleršek)

🔍 Vzorčenje za molekularne analize je podobno običajnemu, a izvajamo ga s čistimi rokavicami in razkuženo opremo, da v vzorec ne zaidejo deli dednega zapisa tujih organizmov. Leva fotografija kaže vzorčenje biofilma s kamna, desna pa vzorčenje in filtriranje vode. (foto: Maša Zupančič)



hišni ljubljenci. Za vsemi temi vrstami ostajajo v vodi molekule njihove DNK. Pod izrazom okoljska DNK imamo torej v mislih celotno dednino vseh živih bitij, ki so ali so bila prisotna v tem okolju.

Zaradi njihove velikosti oz. bolje rečeno majhnosti vzorčimo mikroorganizme skupaj z vodo, tako da ta dedni zapis izhaja neposredno iz njihovih celic. Mednje spadajo npr. mikroskopske alge in bakterije. Pri večjih vrstah, kot so npr. ribe in ljudje, pa iščemo DNK kot proste molekule, ki se v okolje prenašajo s telesnimi izločki, z odmrlo kožo, dlakami in podobnim. Te molekule se lahko v vodi ohranijo več dni ali celo več tednov. Še trajnejše so molekule, ki se ujamejo v nanose na dnu voda, saj jih v tem primeru lahko zaznamo leta, desetletja, kdaj pa kdaj celo tisočletja kasneje, kar odpira vrata morebitnim raziskavam izumrlih vrst.

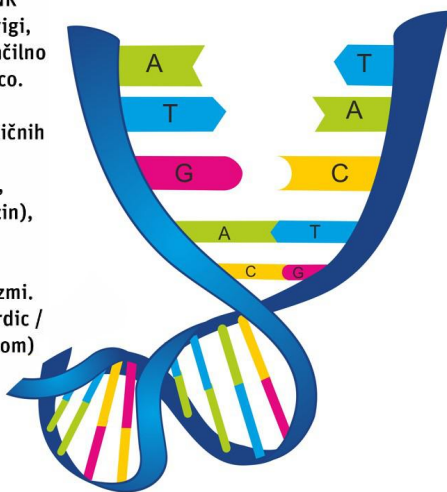
Takšen iz vodnega vzorca pridobljen vzorec okoljske DNK skriva odgovore na številna ekološka vprašanja, le znati jih moramo prebrati. DNK je sestavljena iz dolge verige

gradnikov oz. nukleotidov. Čeprav je iz nje sestavljeno vse življenje na našem planetu, tvorijo abecedo dnevnega zapisa le štiri črke, in sicer A, T, G in C. Te črke predstavljajo štiri različne dušikove baze: adenin, timin, gvanin in citozin. Kodoni ali sklopi treh nukleotidov tvorijo besede, ki sestavljajo stavek oz. gen. Lahko rečemo, da vsak organizem v sebi nosi knjigo, imenovano dednina (genom), torej celoten dedni zapis tega bitja. Takšne knjižne prisposodbe, prirejene po delu Genom avtorja Matta Ridleyja, nas bodo spremljale še naprej in nam pomagale pri razumevanju branja dednega zapisa.

Če takšno knjigo preberemo v celoti, lahko iz dednine seveda brez težav točno določimo vrsto, podvrsto, včasih pa celo zemljepisni izvor in nekatere druge značilnosti organizma. Vendar pa je takšno branje, ki ga imenujemo genomika, dolgotrajno, predvsem pa se ob tem ne moremo izogniti beleženju in nato obdelavi ogromne količine podatkov. Dednina prej omenjene vrbnice je dolga približno 500 milijonov baznih parov in njen celoten zapis bi v računalniškem pomnilniku zasedel približno 125 Mb; če k temu prištejemo še podatke, nujne za razumevanje in obdelavo zapisa, pa se ta vrednost občutno še poveča. Seveda v vzorcih iz vodnih okolij najdemo dedne zapise številnih vrst, upoštevati pa moramo tudi, da v Sloveniji redno spremljamo kakovost voda v 149 jezerih oz. vodotokih. Če bi vsakič v vsakem vzorcu nameravali prebrati celotno dednino vseh prisotnih vrst, bi bila obdelava in shranjevanje tako velike količine podatkov težavna in dolgotrajna.

Razen tega nas pri določanju ekološke slike vsi v vodi prisotni orga-

➤ Molekulo DNK sestavljata verigi, povezani v značilno dvojno vijačnico. Tvorijo ju nukleotidi različnih dušikovih baz (adenin, timin, gvanin in citozin), ki se paroma povezujejo z vodikovimi vezmi. (vir: Soleil Nordic / Shutterstock.com)

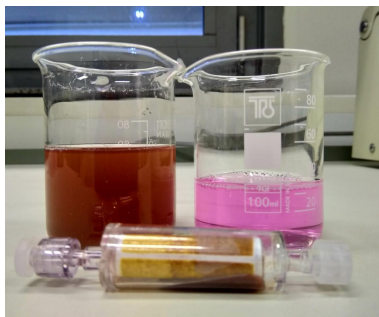


nizmi pravzaprav ne zanimajo, pač pa le izbrane skupine, najbolj seveda prej omenjeni bioindikatorji oz. živa tipala. Zato namesto prebiranja knjige od začetka do konca poiščemo le dele, ki so značilni in edinstveni za posamezne vrste. Za vsako skupino organizmov tako izberemo del dednega zapisa, ki omogoča kar najlažje razlikovanje med vrstami. Pri bakterijah je to npr. odsek gena 16S rRNK, nosilca zapisa za del manjše podenote ribosoma. Zaporedje nukleotidov v izbranem delu mora biti dovolj raznoliko, da omogoči razlikovanje sorodnih vrst, hkrati pa dovolj enotno, da primerkov iste vrste pomotoma ne pripišemo kakšni drugi. Takšnih značilnih delov zaporedij se je prijel izraz črtne oz. bar kode, sam postopek pa imenujemo tudi barkodiranje. Z njim lahko občutno skrajšamo branje zaporedja gradnikov izbranih odsekov DNK.

### ► KNJIŽNICA V LABORATORIJU

Za analizo dednega zapisa vrste moramo tega najprej kar največkrat podvojiti. V vzorcu, ki vsebuje celotne dedne zapise vseh prisotnih vrst, predstavlja namreč izbrani odsek zanemarljivo majhen delež milijonov in milijonov gradnikov (nukleotidov), zato ga ne moremo ločeno analizirati. Predstavljajte si, da bi morali v kupu debelih knjig v vsaki najti določeno besedno zvezo in jo primerjati s tistimi v preostalih knjigah. To bi bila vsekakor dolgotrajna in mučna naloga.

Raziskovalci si zato pomagajo z molekularnim pripomočkom, ki bi ga lahko primerjali z računalniškimi ukazi *išči*, *kopiraj* in *prilepi*, združenimi v enega. Gre za verižno reakcijo



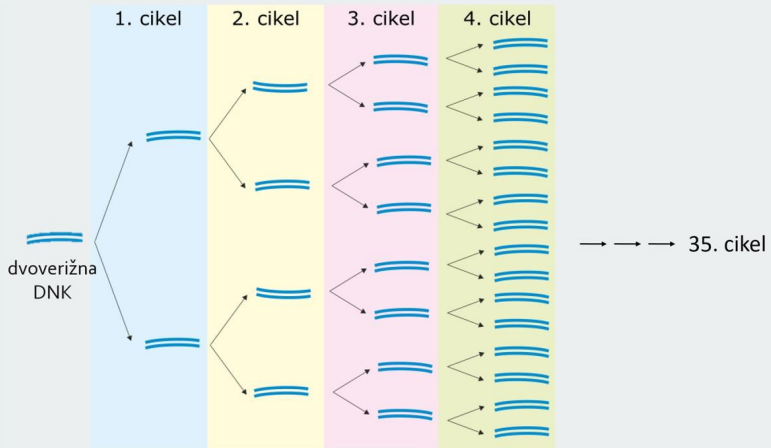
Ⓞ Prvi korak pri izolaciji planktonske DNK iz vzorca vode je filtracija skozi poseben filter s porami velikosti 0,22 μm, ki ujame vse celice mikroorganizmov. Nekatere vrste vzorec izrazito obarvajo in škrlatna barva na fotografiji je posledica cianobakterij vrste *Planktothrix rubescens*. Teh je predvsem pozimi veliko v Blejskem jezeru. (foto: Maša Zupančič)

s polimerazo (PCR), s katero je mogoče v uri ali dveh povečati število delov zelene regije DNK z le nekaj na več milijard. Omenjena verižna reakcija s polimerazo poteka pod istimi pogoji, kot vladajo pri podvajanju DNK v živi celici. Pri tem igrajo ključno vlogo kratki 'iskalni' odseki zaporedja nukleotidov. Ti so, če se spet zatečemo k primerjavi s knjigo, oblikovani tako, da se ujemajo s prvimi in zadnjimi nekaj črkami iskane besedne zveze. V celotni knjigi bodo tako prebrali le izbrani del, preostanek pa prezrli. Drugi pomemben dejavnik pri podvajanju DNK je encim polimeraza, ki 'kopira' in 'lepi' podvojene dele. Takšno podvajanje prav zdaj poteka tudi v nas samih, le da se ob delitvi živih celic podvoji celoten dedni zapis, v laboratoriju pa le izbrani deli.

Po zadostnem številu ponovitev postopka je delež proučevanega dela DNK v vzorcu tako velik, da lahko preostanek zanemarimo. Zdaj imamo namesto debele knjige, polne za nas neuporabnih podatkov, priročno mapo, polno istih zapisov iskane besedne zveze. To besedno zvezo ali naš izbrani odsek DNK moramo zdaj le še prebrati, pri čemer si pomagamo s postopkom, imenovanim določanje zaporedja (sekvenciranje) DNK. Pod ta pojem spadajo številne metode proučevanja, vsem pa je skupno,

Verižna reakcija s polimerazo ali PCR je laboratorijska metoda, s katero lahko pridobimo večje količine želenega dela dednega zapisa. Navadno poteka v 25 do 35 ponavljajočih se ciklih. V vsakem od njih se zaporedje DNK podvoji in

tako lahko iz le majhnega vzorca dokaj hitro ustvarimo več milijard izbranih odsekov dednega zapisa. To nam omogoča analizo izbranega odseka ločeno od preostale dednine oz. genoma. (vir: Soleil Nordic / Shutterstock.com)



da z njimi določamo vrsto vsakega nukleotida posebej, njihovo zaporedje pa zabeležimo z nizom ustreznih črkovnih oznak A, T, G in C.

Po opravljenem določanju zaporedja DNK imamo pred seboj množico črk, ki predstavljajo zaporedja posameznih vrst. Kot pri razume-

vanju tujega jezika nam tudi v tem primeru sama zaporedja ne pomenijo nič, zato si moramo pomagati s slovarjem. Tega v našem primeru predstavljajo podatkovne zbirke ali referenčne knjižnice, ki hranijo obsežne zbirke bioloških podatkov. Mednje spadajo tudi zaporedja



AAGGAGGATTTAGCAGTAA



navadni ostriž



AAGGAGGATTTAGTAGTAA



navadni krap



AAGGTGGATTTAGCAGTAA



potočna postrv

🔗 Poenostavljen prikaz prepoznavanja vrst na podlagi zaporedij gradnikov (nukleotidov). Razlike v posameznih nukleotidih ali daljših odsekih dednine nam pomagajo pri razločevanju med vrstami. (risba: Tine Eleršek)

osnovnih gradnikov številnih vrst organizmov, pridobljena med različnimi raziskavami. Iskanje zaporedij na seznamih organizmov takšnih zbirk poteka s pomočjo različnih računalniških programov. Ti podobno kot brskalniki spletnega slovarja ob vpisu neznane besede poiščejo njen pomen in ga prikažejo v nam razumljivi obliki.

Ko v zbirkah podatkov uspešno najdemo vsa prebrana zaporedja, smo sestavili seznam vseh prepoznanih v vzorcu prisotnih organizmov. Še vedno pa obstajajo številne vrste, ki v podatkovne knjižnice še niso vnešene, saj njihovega dednega zapisa ne poznamo. Takšni primeri so najpogostejši predvsem pri tistih mikroskopskih organizmih, ki jih je v laboratorijih zelo težavno ali pa sploh nemogoče gojiti. Takšne vrzeli v podatkovnih zbirkah DNK lahko zelo otežijo obdelavo rezultatov barkodiranja.

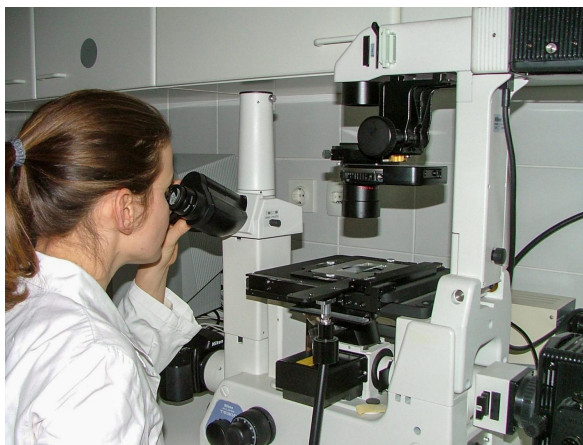
### ► PRIHODNOST OCENJEVANJA EKOLOŠKEGA STANJA VODA

Tovrstno spremljanje in nadzor voda na molekularni ravni ponuja številne prednosti. Poleg boljše zaznavnosti si lahko v prihodnje od te metode obetamo prihranek tako časa kot tudi denarja. Tehnologija določanja zaporedij DNK namreč hitro napreduje, kar znižuje stroške. V primerjavi z zamudnim določanjem vrst organizmov s prostim očesom ali pod mikroskopom so molekularne metode zmogljivejše, omogočajo pa tudi hitro sočasno analizo več vzorcev. Razen tega bi jih lahko uporabili tudi za zaznavanje dednega zapisa manj številčnih vrst, ki jih z običajnimi metodami težko ali pa sploh ne moremo najti.

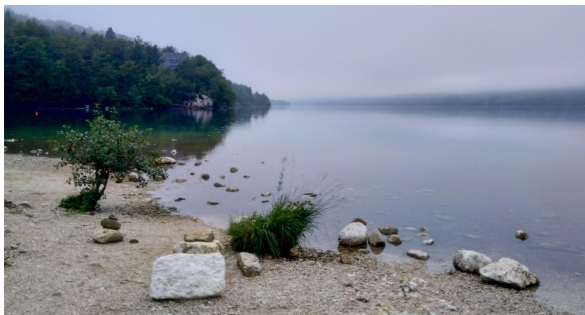
Spremljanje ekološkega stanja temelji na dolgotrajnem zbiranju in beleženju podatkov, pri čemer je ključnega pomena njihovo zajemanje po enaki metodologiji. Nove metode zato zahtevajo ovrednotenje zanesljivosti in primerjavo z rezultati doslej običajnih postopkov. Poleg tega je za vsako vrsto vodnega okolja posebej opredeljeno referenčno stanje, torej razmere brez opaznega ali pa kvečjemu s sorazmerno majhnim vplivom človeka. To stanje služi kot izhodišče za določanje ekološke kakovosti, saj lahko le s primerjanjem trenutnih razmer z referenčnimi znanimo morebitna odstopanja. Ker pa je bilo referenčno stanje določeno na podlagi trenutno uveljavljenih metod, bo treba pred uvajanjem molekularnih pristopov prilagoditi obstoječe biološke indekse in referenčne pogoje. Nenazadnje pa bo potrebno spremeniti tudi postopek odvzemanja vzorcev, da vanj ne bi zašel DNK za ta vodna okolja tujih organizmov.

Reševanje takšnih in podobnih izzivov je predmet številnih raziskav, s katerimi se ukvarjajo mreže znanstvenih ustanov po vsem svetu. Nekatere države so že pričele

☛ Poleg molekularnih metod si pri razvrščanju večjih organizmov pomagamo s prostim očesom in povečevalnim steklom, pri manjših pa z mikroskopom. Za takšno delo sta nujni visoka usposobljenost in bogate izkušnje, saj morfoloških razlik med sorodnimi vrstami nestrokovnjak ne bi opazil. (foto: Arhiv NIB)







Ob vsakoletnem ocenjevanju ekološkega stanja dosega Bohinjsko jezero oceni dobro ali zelo dobro (vir: ARSO). Pri tem je redno spremljanje vseh elementov kakovosti ključnega pomena. (foto: Maša Zupančič)

uvajati barkodiranje DNK v sklopu spremljanja ekološkega stanja voda. Prva evropska država, ki se je odločila za ta korak, je bila Velika Britanija, kjer so pred leti razglasili začetek tovrstnega spremljanja kremenastih alg, enega od ključnih živih tipal vodnih okolij. Vendar pa se takšnih sprememb ne gre lotevati nepremišljeno, zato se velja že zaradi zgoraj naštetega držati postopnega uvajanja. Nove metode naj bi predvsem dopolnjevale, ne pa tudi povsem nadomestile uveljavljenih.

### ▶ KAJ PA PRI NAS?

V Sloveniji takšno spremljanje in nadzor stanja voda še ni uveljavljen, bodo pa to omogočile trenutne raziskave.

Najbrž se še ne zavedamo vseh prednosti tovrstnega spremljanja ekološkega stanja voda, a znanstvena dognanja bodo sčasoma pokazala, kako jih kar najbolje izkoristiti. Cilj je razviti kar najboljšo strategijo za vse vrste vodnih okolij in bioloških elementov kakovosti, ki bo s pomočjo tako že uveljavljenih kot tudi novih metod omogočila celovit vpogled v dejansko stanje združb živih bitij in vodnega okolja ob kar najmanjši porabi časa in sredstev.

Treba je poudariti, da molekularne metode najbrž nikoli ne bodo povsem izpodrinile do sedaj uporabljenih in

da bomo usposobljene strokovnjake za določanje vrst po njihovih zunanjih značilnostih in zgradbi potrebovali še dolgo. Morfološke metode so še vedno koristne, uporabnih orodij pa ne gre kar tako zavreči. To še posebej velja pri dejavnostih življenjskega pomena, med katere ohranjanje vodnih virov tako za nas kot tudi za bodoče rodove nedvomno sodi.

### VIRI IN LITERATURA

- ▶ [1] Špela Ambrožič [et al.]: Kakovost voda v Sloveniji; Agencija RS za okolje, Ljubljana, 2008.
- ▶ [2] Mojca Dobnikar Tehovnik [et al.]: Program monitoringa kemijskega in ekološkega stanja voda: Program za obdobje 2016 in 2021; Agencija RS za okolje, Ljubljana, 2017.
- ▶ [3] Daniel Hering [et al.]: Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive; Water Research 138, 2018, str. 192–205.
- ▶ [4] Agencija Republike Slovenije za okolje: Ekološko stanje celinskih voda; Agencija Republike Slovenije za okolje, Ljubljana, 2021.

### SPLETNI NASLOVI

- ▶ <https://tinyurl.com/2z4e22du> brošura Agencije RS za okolje o ekološkem stanju celinskih voda
- ▶ <https://tinyurl.com/vz84uu2k> poročila Agencije RS za okolje o monitoringu stanja površinskih voda
- ▶ <https://dnaquahub.eu/> interaktivna platforma mreže znanstvenikov o molekularnem monitoringu stanja voda
- ▶ <https://ibol.org/> največji mednarodni konzorcij za DNK raziskave biotske raznovrstnosti
- ▶ <https://tinyurl.com/49brvwk5> gradiva za izobraževalne aktivnosti o genetiki in genomiki
- ▶ <https://tinyurl.com/36s2wwxh> dodatne informacije o okoljski DNK