

## GENETSKA RAZNOLIKOST BAKTERIJ V ČREVESU ENAKONOŽNIH RAKOV (*Isopoda, Crustacea*)

Rok KOSTANJŠEK<sup>a)</sup>, Jasna ŠTRUS<sup>b)</sup> in Gorazd AVGUŠTIN<sup>c)</sup>

<sup>a)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za biologijo, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, asist., mag.

<sup>b)</sup> Isti naslov, izr.prof., dr.

<sup>c)</sup> Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija, izr.prof. dr., mag.

Delo je prispelo 1999-09-29, sprejeto 2000-04-10.

Received September 29, 1999, accepted April 10, 2000.

### IZVLEČEK

V predelu zadnjega črevesa enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber* smo z vrstično elektronsko mikroskopijo odkrili paličaste bakterije, ki se s konci pritrdijo na kutikularne izrastke črevesne stene. Pritrjene bakterije so lahko del avtohtone črevesne mikroflore enakonožnih rakov, katere obstoj še ni bil potrjen. Ker opisanih bakterij ni mogoče gojiti s klasičnimi gojitvenimi tehnikami, smo iz spranih čreves petih zdravih odraslih rakov izolirali skupno DNK, iz katere smo s PCR namnožili bakterijske gene za 16S rRNK. Te gene smo vključili v plazmidni vektor in jih transformirali v kompetentne celice *E.coli*. Iz klonov izolirano plazmidno DNK smo razkrojili z restrikcijskima encimoma *DdeI* in *TaqI* in na podlagi restrikcijskih profilov z metodo UPGMA naredili fenogram. 37 preiskanih genov za 16S rRNK lahko na podlagi restrikcijskih profilov razdelimo v vsaj tri večje skupine, kar kaže, da se na kutikularne trne v črevesu *P.scaber* morda pritrdjuje več različnih bakterijskih vrst.

Ključne besede: enakonožni raki / črevo / mikrobiologija / bakterije / genetska raznolikost / 16S rDNK / RFLP

## GENETIC DIVERSITY OF BACTERIA INHABITING THE GUT OF ISOPODS (*Isopoda, Crustacea*)

### ABSTRACT

Rod-like bacteria attached to cuticular spines in the hindgut of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* were observed by scanning electron microscopy. The attached bacteria could represent the autochthonous microbial flora, which has not been reported yet. Because the observed bacteria can not be cultured, molecular approach to identification was applied. Total DNA was isolated from well rinsed hindguts of five healthy and mature isopods and subsequently bacterial 16S rDNA genes were amplified. The amplified genes were incorporated into plasmid vector and transformed into *E.coli* competent cells. Plasmid DNAs from 37 transformants were subjected to restriction analysis with *Dde I* and *Taq I* endonucleases. An RFLP phenogram was constructed using the UPGMA method. 16S rRNA genes can be clustered into at least three distinctive groups which could indicate that several bacterial species are attached to the cuticular spines in the hindgut of *P. scaber*.

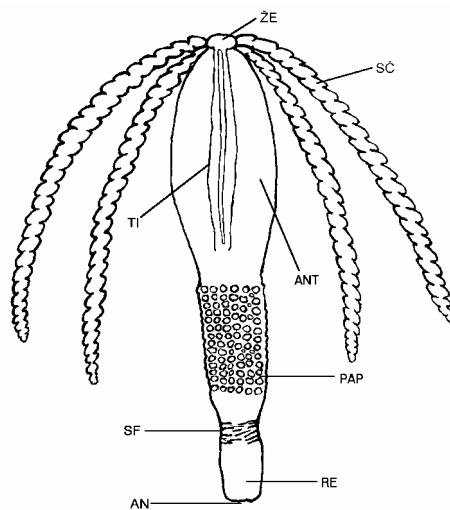
Key words: isopoda / intestine / microbiology / bacteria / genetic diversity / 16S rDNA / RFLP

### UVOD

Kopenski enakonožni raki sodijo med pomembnejše razkrojevalce listne stelje, ki omogočajo nastanek prsti. Mikroorganizmi v črevesju rakov so ključni za uspešen potek razkroja

sestavljenih organskih spojin, predvsem celuloze in hemiceluloze. Podatkov o mikroorganizmih, ki naseljujejo prebavni trakt in iztrebke enakonožnih rakov pa je kljub pomenu zelo malo.

Črevo enakonožnih rakov je približno 1 cm dolga cev, brez zaprtih predelov, v katerih bi se hrana lahko zadrževala dalj časa. Prebavni trakt je iz treh delov: sprednjega, srednjega in zadnjega črevesa (Holdich in Ratcliffe, 1970, Hames in Hopkin, 1989). Hrana iz ust potuje v kratko sprednje črevo, ki je iz požiralnika in mišičastega želodca. Želodec preprečuje vračanje hrane nazaj v požiralnik in usmerja tekoči del hrane v srednje črevo, neprebavljeni del hrane pa v zadnje črevo, ki se odpira neposredno v želodec (Storch, 1987). Sprednje in zadnje črevo sta prekrita s kutikulo. Živali jo levijo približno enkrat mesečno in takrat se ob levitvi odstrani vsa površina črevesa, ki je v stiku s hrano (Palackal, 1984, Štrus in Storch, 1990). Srednje črevo je iz dveh parov zaprtih cevi, ki ležita ob zadnjem črevesu in se odpirata v želodec. V srednjem črevesu se izločajo prebavni encimi in privzemajo hranila. Zadnje črevo zavzema skoraj 90% dolžine črevesa. Sestavljeno je iz sprednjega dela (anteriorne regije), srednjega dela (papilatna regija) in rektuma, ki se konča z anusom (Hopkin in Martin, 1984). Dorzalno v anteriorni regiji leži guba (tiflosolis), ki tvori dva kanala. Glavni del prebave poteka v anteriorni regiji, v katero vstopa mehansko obdelana hrana prepojena z encimi, ki nastajajo v srednjem črevesu. Prebavljena hrana potuje iz anteriorne regije po tiflosolisu nazaj v želodec in od tam v srednje črevo, kjer se absorbira. Neprebavljena hrana nadaljuje pot skozi papilatno regijo, kjer se iz vsebine črevesa reabsorbira voda, ioni in ostanek hranil, v rektumu pa se oblikujejo iztrebki, ki jih žival izloči skozi anus (Hartenstein, 1964, Vernon in sod., 1974, Palackal, 1984, Lane, 1988, Hames in Hopkin, 1989, Storch in Štrus, 1989) (Slika 1).



Slika 1. Prebavilo enakonožnega raka *P. scaber*. (ŽE - želodec, SČ - srednje črevo, ANT - anteriorna regija zadnjega črevesa, TI - tiflosolis, PAP - papilatna regija zadnjega črevesa, SF - sfinkter, RE - rektum, AN - anus)

Figure 1. Intestinal tract of isopod *P. scaber*. (ŽE - stomach, SČ - midgut, ANT - anterior region of hindgut, TI - typhlosol, PAP - papillate region of hindgut, SF - sphincter, RE - rectum, AN - anus)

Glavna hrana enakonožnih rakov je les, t.j. njegova glavna sestavina lignoceluloza. Za prebavo lignoceluloze so potrebne celulaze, ksilanaze in drugi encimi mikrobnega izvora. Mikroorganizmi, sposobni razkroja lignoceluloze, so že v hrani (Hassal in Jennings, 1975, Kukor in Martin, 1986), čeprav nekateri avtorji celulazno aktivnost pripisujejo endosimbiontom srednjega črevesa (Zimmer in Topp, 1998 a,b,c). Prebavilo gostitelja je ugodno okolje za mikroorganizme, ki se tam močno namnožijo, gostitelj pa jih nato izkorišča kot vir encimov,

aminokislin in vitaminov. Verjetno prihaja med izopodnimi raki in bakterijami (tako v okolju kot v črevesju živali) do tekmovanja za lažje dostopne oblike ogljikovih hidratov. Ti so najpogostejši v starejši listni stelji, ki jo raki najraje jedo (Van Wensem, 1993).

Po mnenju nekaterih avtorjev naj bi se v črevesu enakonožnih rakov vzpostavila stalna mikrobnna flora. Znano je, da so določene skupine ubikvitarnih mikroorganizmov stalno prisotne v črevesu enakonožnih rakov (Reyes in Tiedje, 1976, Ineson in Anderson, 1985, Gunnarson in Tunlid, 1986, Griffiths in Wood, 1985). Ti mikroorganizmi predstavljajo normalno floro gostitelja, o obstoju avtohtone flore pa do sedaj ni bilo nedvoumnih podatkov (avtohtona črevesna flora je tisti del normalne flore, ki se je v procesu koevolucije spreminjal in razvijal skupaj z gostiteljem (Dubos, 1965)). Delci hrane in mikroorganizmi sicer lahko zaidejo v gube črevesa in se zadržijo v njem tudi do več kot dva tedna, vendar je to po mnenju nekaterih raziskovalcev posledica bodisi mehanskega zadrževanja bodisi koprofagije, ne pa specifične pritrditve bakterij na površino črevesa (Clegg in sod., 1996).

Zaradi prepričanja, da avtohtone črevesne mikroflore pri enakonožnih rakih ni, so pozornost raziskovalcev pritegnile paličaste bakterije v papilatni regiji zadnjega črevesa enakonožnih rakov, ki so s konci pritrjene na konice trnastih izrastkov kutikule zadnjega črevesa (Drobne, 1995, Štrus in sod., 1995). Na posamezen trn je lahko pritrjena ena ali več paličastih bakterij. V takem primeru se bakterije razporedijo v obliki t.i. rozete. Tako tesna povezava mikroorganizma in gostitelja kaže na trajnejšo naravo odnosa in s tem na možno koevolucijo gostitelja in mikroorganizma. Omenjene bakterije so morda predstavniki prave avtohtone črevesna mikroflore enakonožnih rakov.

Bakterije s podobno morfologijo naseljujejo tudi zadnje črevo višjih termitov (Czolij in sod., 1985), ščurkov (Bracke, 1979) in deseteronožnih rakov (Harris, 1993). Za omenjeni skupini žuželk je znano, da imajo v črevesju avtohtone simbiotske mikroorganizme, ki omogočajo razkroj kompleksnih organskih spojin, kot sta celuloza in hemiceluloza. Omenjene spojine so tudi pri enakonožnih rakih glavni vir ogljika, mikroorganizmov, ki bi neposredno sodelovali v omenjenih procesih, pa še ne poznamo (Hartenstein, 1964, Hassal in Jennings, 1975, Kaplan in Hartenstein, 1978, Kukor in Martin, 1986, Ullrich in sod., 1991). Identifikacija pritrjenih paličastih bakterij v črevesu enakonožnih rakov je zato pomembna tako zaradi ugotavljanja biološke pestrosti kot zaradi podatkov pri ocenjevanju ekološkega pomena teh mikroorganizmov.

## MATERIAL IN METODE

Poskusne živali *Porcellio scaber* Latreille smo gojili v steklenih terarijih pri temperaturi 22 do 24° C in pri visoki vlagi, ki smo jo vzdrževali s škropljenjem z destilirano vodo. Živali smo hranili s posušenimi listi leske (*Corylus avellana* L.). V poskusih smo uporabili zdrave odrasle živali obeh spolov.

Preparate za vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM) smo fiksirali dve uri v mešanici 0,5% glutaraldehida in 1,5% paraformaldehida v 0,1M fosfatnem pufru. Sledila je fiksacija z OsO<sub>4</sub> in dehidracija vzorcev preko serije alkoholov naraščajočih koncentracij, acetona in HMDS (heksametildisilazan, Merck) (Zidar 1998). Posušene vzorce smo pritrtili na aluminijaste nosilce, jih naprašili z zlatom in opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom JEOL 840A.

Za molekulsko genetsko analizo bakterij smo omamljenim živalim s sterilno pinceto odstranili črevo in ga po dolžini odprli s sterilno volframovo iglo. Vsebino črevesa smo sprali s sterilno fiziološko raztopino, odstranili anteriorno regijo in rektum ter prenesli papilatno regijo na sterilno objektno stekelce. Tako pripravljen preparat smo opazovali z mikroskopom (BX 50, Olympus Optical Co., Japonska) s faznim kontrastom pri 1000-kratni povečavi. Iz črevesa petih živali, pri katerih smo opazili veliko število pritrjenih paličastih bakterij, smo sterilno izrezali

predel papilatne regije z največjo gostoto omenjenih bakterij. Izrezane papilatne regije smo združili in jih sterilno homogenizirali v fiziološki raztopini z ročnim homogenizatorjem.

Iz vzorca smo izolirali skupno DNK po že opisanem postopku (Mäntynen in Lindström, 1998). Izolirano DNK smo uporabili kot matrico v verižni reakciji s polimerazo DNK (PCR), v kateri smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida, ki nalegata na začetek in konec genov za 16S rRNK bakterij. To sta začetni oligonukleotid fD1 (5' ccgaattcgtcgacaac AGAGTTTGATCCTGGCTCA G 3') (*E. coli* mesto 7-26, Weisburg in sod., 1991) in začetni oligonukleotid 1492 (5' aagcttgccggccgcACGGGCGGTGTGT(AG)C 3') (*E. coli* mesto 1492-1513, Lane, 1991). Začetni oligonukleotid fD-1 ima dodano prepoznavno zaporedje za restrikcijski encim *Sal I*, 1492 pa za restrikcijski encim *Not I* (zapisano z malimi črkami).

Namnožene gene za 16s rRNK smo neposredno vključili v plazmidni vektor pBluescript II KS+ (Stratagene, La Jolla) in jih transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH 5- $\alpha$  (Gibco BRL). Na podlagi modro-bele selekcije smo izbrali 37 klonov z vključenim plazmidom in iz njih z alkalno lizo izolirali plazmidno DNK. Plazmidno DNK smo razrezali z encimoma *Taq I* in *Dde I* in iz profilov RFLP izračunali Jacquardove koeficiente podobnosti. Na podlagi teh smo z metodo UPGMA naredili fenogram (NTSYS pc 1.80 package, Applied Biostatistics Inc., Rohlf, 1994).

## REZULTATI IN RAZPRAVA

Paličaste bakterije, pritrjene na kutikularne trne v črevesu enakonožnih rakov *P. scaber*, so najprej odkrili z pregledovanjem vzorcev z vrstično elektronsko mikroskopijo (Drobne, 1995, Štrus in sod., 1995). Na mikrofotografiji lahko vidimo paličaste bakterije, ki so v večjem številu pritrjene na konice kutikularnih trnov in pri tem tvorijo rozetaste skupke (Slika 2a). Preparate smo opazovali tudi s svetlobno fazno kontrastno mikroskopijo in prav tako opazili značilne rozetaste strukture (slika 2b). S fazno kontrastno mikroskopijo smo v nadaljevanju preverjali uspešnost spiranja črevesa, s katerim smo želeli odstraniti vse nepritrjene mikroorganizme.



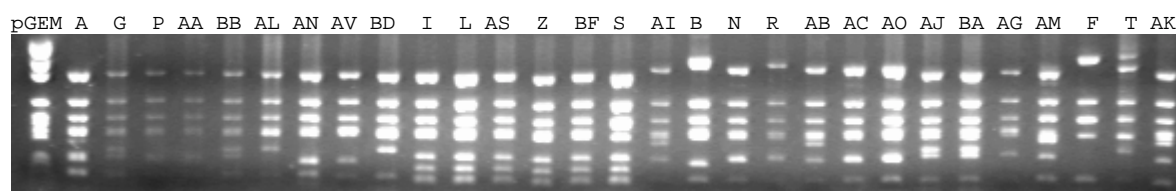
Slika 2. Mikrofotografija paličastih bakterij, pritrjenih na kutikularne trne v papilatni regiji z vrstično elektronsko mikroskopijo (a) in faznim kontrastom (b). ► - pritrjena bakterija, t - kutikularni trn, R - pritrjene bakterije razvrščene v obliki rozete. Oznaka predstavlja 1 $\mu$ m.

Figure 2. Scanning electron micrography (a) and phase contrast light microscopy (b) showing rod-like bacteria attached to the cuticular spines in papillate region of the hindgut. ► - rod-like bacteria, t - cuticular spine, R - attached bacterias in rosette-like shape aggregats. Bar 1 $\mu$ m.

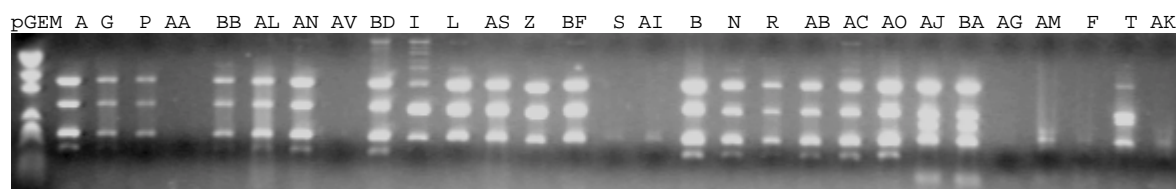
Z *in situ* hibridizacijskimi postopki, v katerih smo uporabili dve za bakterije specifični oligonukleotidni sondi, smo želeli neposredno dokazati, da so opažene rozetaste strukture v črevesu bakterije. Kljub številnim različicam postopka, ki smo jih uporabili za fiksacijo celic in obdelavo celičnih sten (DeLong in sod., 1989, Braun-Howland in sod., 1992, Hahn in sod., 1993, Macnaughton in sod., 1994, Roller in sod., 1994, Trembeau in Bloom, 1995) fluorescentnega signala nismo zaznali. Uporabili smo evolucijsko ohranjeni oligonukleotidni sondi fD1 (Weisburg in sod., 1991) in Eub 338 (Amman, 1995), označeni s fluorokromi TRITC oz. FITC (Tepšič in Avguštin, 1997). V nekaterih primerih je opazovanje motila močna avtofluorescenca črevesnega tkiva, vendar fluorescence sond nismo zasledili tudi v primerih, ko smo uspeli avtofluorescenco zadušiti.

Možna razlaga za neuspeh sta nizka presnovna aktivnost pritrjenih bakterij in s tem povezano majhno število ribosomov na celico (Schaechter in sod., 1958, DeLong in sod., 1989). Zato se majhno število sond veže na tarče v posameznih celicah in je fluorescenca, ki jo sonde oddajajo preslabotna, da bi jo opazili. Možno je tudi, da pritrjeni mikroorganizmi niso bakterije, temveč arheje (čeprav so le-te običajno vezane na bolj ekstremna okolja) in je vzrok neuspešne hibridizacije uporaba bakterijskih in ne arhejskih sond.

Ker z *in situ* hibridizacijo nismo uspeli dokazati, da so mikroorganizmi v rozetastih skupkih bakterije, smo se odločili, da bomo poskusili namnožiti njihove ribosomske gene v verižni reakciji s polimerazo DNK (PCR). Izbrali smo vzorce črevesa, v katerih je bilo po intenzivnem spiranju črevesa opaznih še vedno dovolj pritrjenih bakterij. Vzorce smo združili in iz njih izolirali skupno DNK, ki smo jo v reakciji PCR uporabili kot matrico. Za namnoževanje smo uporabili začetna oligonukleotida, značilna za bakterije in uspešno namnožili gene za manjšo ribosomsko podenoto, to je 16S rRNK. Začetni oligonukleotidi so vsebovali restriksijska mesta za *SalI* in *NotI* restriksijski endonukleazi. Po čiščenju produkta PCR smo le-tega vključili v plazmidni vektor pBluescript in z njim transformirali celice *E. coli* DH 5- $\alpha$ . Po belo-modri selekciji smo naključno izbrali 37 belih klonov, izolirali plazmidno DNK in jo razrezali z restriksijskima endonukleazama *DdeI* in *TaqI* (Sliki 3a in 3b). V primeru dvomljivega ali nejasnega profila (slika 3b, proge AA, AV, S, AI, AG, AM, in AK) smo restrikcijo ponovili (rezultati niso prikazani).



3a

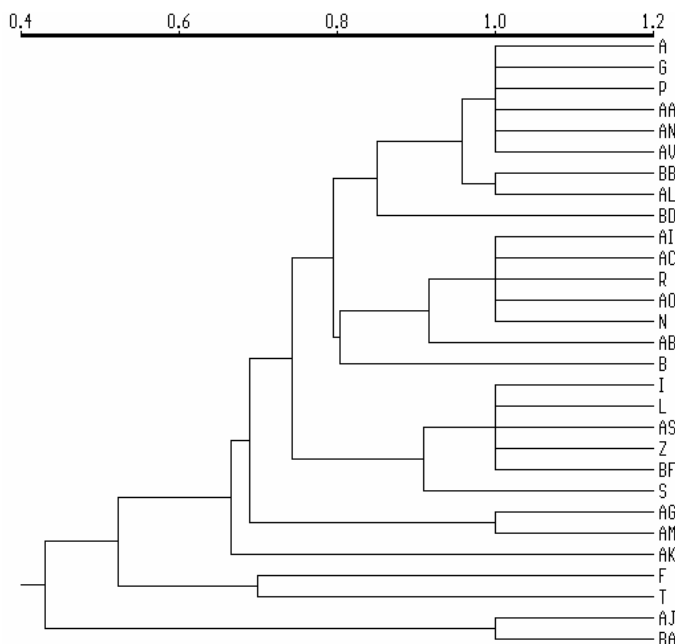


3b

Slika 3. Vzorec RFLP plazmidne DNK 37 klonov razrezanih z restriksijskima endonukleazama *DdeI* (a) in *TaqI* (b) (velikostni standard: pGEM, kloni: A - AK)

Figure 3. RFLP profiles of plasmid DNAs from 37 clones restricted with restriction endonucleases *DdeI* (a) and *TaqI* (b) (size marker: pGEM, clones: A - AK)

Opažene fragmente v vsakem vzorcu smo ovrednotili in podatke vnesli v matriko, iz nje pa izračunali Jacquardove koeficiente podobnosti. Iz teh smo naredili UPGMA fenetski dendrogram (Slika 4), na katerem lahko vidimo, da se preiskani kloni razvrstijo v tri večje in nekaj manjših skupin s koeficientom podobnosti 1,0.



Slika 4. Nekoreninjen dendrogram, narejen na osnovi RFLP vzorca plazmidov 37 klonov rezanih z *DdeI* in *TaqI*

Figure 4. Unrooted dendrograms constructed from RFLP profiles of plasmids from 37 clones restricted with *DdeI* and *TaqI*

Glede na intenzivno metodo spiranja smo pričakovali le en tip pomnoženih genov za 16S rRNK. Presenetljivo velika raznolikost je lahko posledica: 1) okužbe izolirane DNK; 2) nezadostnega spiranja čreves, t.j. odstranjevanja mikroorganizmov, ki niso pritrjeni na trne; 3) genotipske raznolikosti mikroorganizmov, ki se pritrjujejo na trne; 4) razlik v kopijah ribosomskih genov.

V nadaljevanju nameravamo klonirane gene za 16S rRNK natančneje preučiti in ugotoviti njihove nukleotidne sekvence. Prav tako nameravamo z *in situ* PCR tehniko ugotoviti, ali so rozetaste strukture v črevesu metabolno neaktivne bakterije, ki imajo zato zelo majhno število ribosomov v vsaki celici, kar onemogoča uspešno dokazovanje z *in situ* hibridizacijo.

## POVZETEK

Kopenski enakonožni raki so pomembni razkrojevalci organskih polimerov v listni stelji. Črevesna mikrobna flora pri razkroju organskih snovi najverjetneje tesno sodeluje s svojim gostiteljem, vendar je še vedno slabo poznana in opisana. Po nekaterih podatkih v črevesu enakonožnih rakov ni avtohtone mikrobne flore. V predelu zadnjega črevesa enakonožnih rakov vrste *Porcellio scaber* smo z vrstično elektronsko mikroskopijo odkrili paličaste bakterije, ki so s konci pritrjeni na kutikularne izrastke notranje črevesne površine. Zaradi značilne povezave med gostiteljem in mikroorganizmi domnevamo, da na trne pritrjene bakterije predstavljajo avtohtono črevesno mikrofloro enakonožnih rakov. Ker opisanih bakterij ni mogoče gojiti s klasičnimi gojitvenimi tehnikami, smo za identifikacijo uporabili molekulske biološke prijeme. Iz čreves

rakov, ki so vsebovala veliko število pritrjenih bakterij, smo izolirali skupno DNK, iz nje pa s PCR namnožili bakterijske gene z zapisom za 16S rRNK. Te gene smo klonirali v plazmidni vektor pBluescript KS II in jih transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH-5 $\alpha$ . Iz 37 naključno izbranih klonov smo izolirali plazmidno DNK in jo razkrojili z restrikcijskima encimoma *DdeI* in *TaqI*. Na podlagi restrikcijskih profilov smo z metodo UPGMA naredili fenogram in ugotovili, da lahko gene za 16S rRNK preiskanih klonov na podlagi restrikcijskih profilov razdelimo v vsaj tri večje skupine. To morda pomeni, da se na kutikularne trne v črevesu *P.scaber* pritrja več različnih bakterijskih vrst.

## SUMMARY

Terrestrial isopods are important decomposers of organic polymers. Although intestinal microflora probably plays the crucial role in decomposition, it is only poorly known. Rod-like bacteria attached to cuticular spines in the hindgut of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* were observed by scanning electron microscopy. A close relationship between host and attached microorganisms suggests that rod-like bacteria represent autochthonous microbial flora, the existence of which has not been reported yet. Because rod-like bacteria cannot be cultured, molecular approach to identification was applied. Total DNA was isolated from isopod hindguts, which contained high numbers of rod-like bacteria, and bacterial 16S rDNA genes were subsequently amplified. The amplified genes were incorporated into pBluescript KS II vector and transformed into *E. coli* DH-5 $\alpha$  cells. Plasmid DNAs from 37 transformants were subjected to RFLP analysis with *DdeI* and *TaqI* restriction endonucleases. On the RFLP basis a phenogram was constructed using the UPGMA method. 16S rRNA genes can be clustered into three larger and several smaller distinctive groups. This could indicate that more than one bacterial species is attached to the cuticular spines in the hindgut of *P.scaber*.

## ZAHVALA

Zahvaljujemo se dr. Kazimirju Drašlarju za pomoč pri delu s SEM.

## VIRI

- Amman, R.I./ Ludwig, W./ Schleifer, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1) (1995), 143-169.
- Bracke, J.W./ Cruden, D.L./ Markowitz A.J. Intestinal Microbial Flora of the American Cockroach, *Periplaneta americana* L. *Appl. Env. Microbiol.* 38(5) (1979), 945-955.
- Braun-Howland, E.B./ Danielsen, S.A./ Nierzwicki-Bauer, S.A. Development of a rapid method for detecting bacterial cells in situ using 16S rRN-targeted probes. *BioTechniques* 13(6) (1992), 928-933.
- Clegg, C.D./ Anderson, J.M./ Lappin-Scott, H.M. Biphysical process affecting the transit of a genetically-modified *Pseudomonas fluorescens* through the gut of the woodlouse *Porcellio scaber*. *Soil Biol. Biochem.* 28(8) (1996), 997-1004.
- Czolij, R./ Slaytor, M./ O'brien. Bacterial Flora of the Mixed Segment and the Hindgut of the Higher Termite *Nasutitermes exitiosus*, Hill (Termitidae, Nasutitermitidae). *Appl Env. Microbiol.* 49(5) (1985), 1226-1236.
- DeLong, E./ Wickham, G.S./ Pace, N.R. Phylogenetic strains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells, *Science* 243 (1989), 1360-1363.
- Drobne, D. Bacteria adherent to the hindgut of terrestrial isopods. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* 42(1) (1995), 45-52.
- Dubos, R./ Schaedler, R.W./ Costello, R./ Hoet, P. Indigenous, normal and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. exp. med.* 122 (1965), 67-75.
- Griffiths, B. S./ Wood, S. Microorganisms associated with the hindgut of *Oniscus asellus* (Crustacea, Isopoda). *Pedobiologia* 28 (1985), 377-381.

- Gunnarson, T./ Tunlid, A. Recycling of faecal pellets in isopods: microorganisms and nitrogen compounds as potential food for *Oniscus asellus* L.. Soil. Biol. Biochem. 18(1986), 595-600.
- Hahn, D./ Amman, R./ Ludwig, W./ Akkermans, A.D.L./ Schleifer K. Detection of micro-organisms in soil after in situ hybridization with rRNA targeted, fluorescently labelled oligonucleotides. J. Gen. Microbiol. 138 (1992), 879-887.
- Hahn, D./ Amman, R./ Zeyer, J. Whole-cell hybridization of Frankia strains with fluorescence- or digoxigenin-labelled, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes, Appl. Environ. Microbiol. 59(6) (1993), 1709-1716.
- Hames, C. A. C./ Hopkin, S. P. The structure and function of the digestive system of terrestrial isopods. Zool. Lond. 217 (1989), 599-627.
- Harris, J.M. Widespread occurrence of extensive epimural rod bacteria in the hindguts of marine Thalassinidae and Brachyura (Crustacea: Decapoda). Marine Biology. 116 (1993), 615-629.
- Hartenstein, R. Feeding, digestion, glycogen, and the environmental conditions of the digestive system in *Oniscus asellus*. J. Ins. Physiol. 10(1964), 611-621.
- Hassal, M./ Jennings, J. B. Adaptive features of gut structure and digestive physiology in the terrestrial Isopod *Philoscia mucosorum* (Scopoli) 1763. Biol. Bull. 149 (1975), 348-364.
- Holdich, D.M./ Ratcliffe N.A. A Light and Electron Microscope Study of the Hindgut of the Herbivorous Isopod, *Dynamene bidentata*. Z. Zellforsch. 111(1970), 209-227.
- Hopkin, S.P./ Martin, M.H. Heavy metals in Woodlice. Symp. Zool. Soc. Lond. 53 (1984), 143-166.
- Ineson, P./ Anderson, J. M. Aerobically isolated bacteria associated with the gut and faeces of the litter feeding macroarthropods *Oniscus asellus* and *Glomeris marginata*. Soil. Biol. Biochem. 17(6) (1985), 843-849.
- Kukor, J.J./ Martin, M.M. The effect of acquired microbial enzymes on assimilation efficiency in the common woodlouse *Tracheoniscus rathkei*. Oecologia 69 (1986), 360-366.
- Lane, R.L. The digestive system of *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Isopoda, Oniscoidea): Histology and Histochemistry. Crustaceana 55 (2) (1988), 113-128.
- Mäntynen, V./ Lindström, K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., 64(5) (1998), 1634-1639.
- Palackal, T./ Faso, L./ Zung, J.L./ Vernon, G./ Witkus, R. The Ultrastructure of the Hindgut Epithelium of Terrestrial Isopods and its Role in Osmoregulation. Symp. zool. Soc. Lond. 53 (1984), 185-198.
- Macnaughton, S.J./ O'Donnell, A.G./ Embley, T.M. Permeabilization of mycolic-acid-containing actinomycetes for *in situ* hybridization with fluorescently labelled oligonucleotide probes. Microbiol. 140 (1994), 2859-2865.
- Peterka, M. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana. (1999), 79 s.
- Reyes, V. G./ Tiedje, J. M. Ecology of the gut microbiota of *Tracheoniscus rathkei* (Crustacea, Isopoda). Pedobiologia 16 (1975), 67-74.
- Roller, C./ Wagner, M./ Amman, R./ Ludwig, W./ Schleifer, K. In situ probing of Gram positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. Microbiol. 140 (1994), 2849-2858.
- Rohlf, J.F. NTSYS. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter software, New York, ZDA, 1994.
- Sambrook, J./ Fritsch, E.F./ Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, ZDA (1989).
- Schaechter, M./ Maaloe, O./ Kjølgaard, N.O. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. J. Gen. Microbiol., 19(1958), s.592-606.
- Storch, V. Microscopic anatomy and ultrastructure of the stomach of *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). Zoomorphology 106 (1987), 301-311.
- Storch, V./ Štrus, J. Microscopic anatomy and ultrastructure of the alimentary canal in terrestrial Isopods. Monitore Zool. Ital (N.S.) monogr. 4 (1989), 105-126.
- Štrus, J./ Storch, V. Moulting of the alimentary canal in *Ligia italica* Fab. and *Porcellio scaber* L. (Crustacea: Oniscoidea). Proceedings of the Third International Symposium on the Biology of Terrestrial Isopods. (1990) 189-194.
- Štrus, J./ Drobne, D./ Ličar, P. Comparative anatomy and functional aspects of the digestive system in amphibious and terrestrial isopods (Isopoda: Oniscoidea). In: Terrestrial Isopod Biology (ed. Alikhan, M.A.). Rotterdam, A.A. Baklema, 1995, 15-23.
- Tepšič, K./ Avguštin, G. . Specifično odkrivanje bakterijskih vrst v prebavilih domačih živali z *in situ* hibridizacijo in epifluorescentno mikroskopijo. Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani, Kmetijstvo. Zootehnika, 70(1997), 47-53.
- Trembleau, A./ Bloom, F.E. Enhanced sensitivity for light nad electron microscopic *in situ* hybridization with multiple simultaneous non-radioactive oligodeoxynucleotide probes. J. Histochem. Cytochem.(1995) 829-841.
- Ullrich, B./ Storch, V./ Schairer, H. Bacteria in the food, in the intestine and on the faeces of the woodlouse *Oniscus asellus* (Crustacea, Isopoda). Pedobiologia 35 (1991), 41-51.
- Van Wensem, J. Litter degradation stage as a prime factor for Isopod interaction with mineralization processes. Soil. Biol. Biochem. 23 (1993), 1175-1183.



- Vernon, G.M./ Herold, L./ Witkus, E.R. Fine Structure of the Digestive Tract Epithelium in the Terrestrial Isopod, *Armadilidium vulgare*. J. Morph. 144 (1974), 337-360.
- Wägele, J.W. Isopoda. In: Microscopic anatomy of Invertebrates, vol 9: Crustacea. (ed. Harrison, F.W.). New York, Willey-Liss Inc., 1992, 529-617.
- Weisburg, W.G./ Barns, S.M./ Pelletier, D.A./ Lane, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173 (1991), 697-703.
- Zidar, P. Vrednotenje strupenosti cinka in kadmija na poskusni živali (*Porcello scaber*, Isopoda, Crustacea). Magistersko delo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana. (1998), 56 s.
- Zimmer, M./ Topp, W. Nutritional biology of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): cooper revisited. Israel Journal of Zoology 44 (1998a), 453-462.
- Zimmer, M./ Topp, W. Do woodlouse (Isopoda: Oniscidea) produce endogenous cellulases? Biol. Fert. Soils 26(1998b), 155-156.
- Zimmer, M./ Topp, W. Microorganisms and cellulose digestion in the gut of the woodlouse *Porcellio scaber*. J. Chem. Ecol. 24(8) (1998c), 1397-1408.