

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Monika KOPRIVNIKAR

**PRIPRAVA VCEPKA ZA BIOLOŠKO ČIŠČENJE
VODA S POVIŠANO SLANOSTJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Monika KOPRIVNIKAR

**PRIPRAVA VCEPKA ZA BIOLOŠKO ČIŠČENJE VODA S
POVIŠANO SLANOSTJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**DEVELOPMENT OF SALT TOLERANT INOCULUM FOR
BIOLOGICAL TREATMENT OF WASTEWATERS WITH
ELEVATED SALT CONTENT**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biologijo mikroorganizmov Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za vodarstvo Fakultete za gradbeništvo in geodezijo.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija biologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorja dr. Aleša Lapanjeta in za recenzentko prof. dr. Ano Plemenitaš.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Somentor: dr. Aleš Lapanje

Recenzentka: prof. dr. Ana Plemenitaš

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mihael J. TOMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Aleš LAPANJE
Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o.
Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research, and
Institute of the ETH Board

Članica: prof. dr. Ana PLEMENITAŠ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Datum zagovora: 27.8.2008

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Monika KOPRIVNIKAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 504.4:628.35(043.2)=163.6
KG	vcepek za biološko čiščenje/povišana koncentracija soli/slana odpadna voda/solinske bakterije/solinske glive/biološka čistilna naprava/aktivno blato/kosmičenje/bogatitveno gojišče/NaCl/prilagajanje mikrobne združbe/16S rRNA/16S rDNA/18S rRNA/18S rDNA/TTGE
AV	KOPRIVNIKAR, Monika
SA	GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/LAPANJE, Aleš (somentor)/PLEMENITAŠ, Ana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2008
IN	PRIPRAVA VCEPKA ZA BIOLOŠKO ČIŠČENJE VODA S POVIŠANO SLANOSTJO
TD	Diplomsko delo
OP	XIII, 93 str., 12 pregl., 19 sl., 2 pril., 64 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Globalno segrevanje povzroča bogatenje kopenskega okolja z v vodi raztopljenimi ioni zaradi vse bolj povečanega izhlapevanja vode. Učinkovitost čiščenja odpadne vode se drastično zmanjša ob vdoru slane vode, ki se izpira iz prsti in zasoljenih cestišč, ali vdoru morske vode v kanalizacijski sistem. Zaradi tega je bil namen raziskave pripraviti vcepek mikroorganizmov, ki so prilagojeni na razmere v slani odpadni vodi in se jih lahko vnese v čistilno napravo v razmerah povišane slanosti. Z uporabo gojitvenih tehnik smo obogatili zelene mikroorganizme v gojišču, ki je ustrezalo slani odpadni vodi. Na takšne razmere prilagojene mikroorganizme iz solin in za primerjavo tudi tiste, ki niso prilagojeni, smo vcepili v modele čistilnih naprav in primerjali njihovo učinkovitost čiščenja vode. Ugotovili smo, da je združba prilagojenih mikroorganizmov učinkovitejša pri odstranjevanju organskih snovi od solinskih mikroorganizmov iz okolja in od takih, ki pridejo v čistilno napravo iz zraka ali vode. Z molekularno analizo smo dobili podatke o spreminjanju bakterijskih in glivnih združb tekom bogatenja. Mikroorganizmom, ki so se najuspešneje razmnoževali v bogatitvah in v modelih čistilnih naprav, smo določili filogenetsko pripadnost. V bogatitvah solinskih mikroorganizmov so bile ob koncu raziskave dominantne bakterije iz rodov <i>Marinobacter</i>, <i>Halomonas</i> in <i>Idiomarina</i> ter glive, sorodne rodovom <i>Saccharomyces</i>, <i>Candida</i>, <i>Didymella</i> in <i>Acremonium</i>. V bogatitvah aktivnega blata smo določili bakterijske rodove <i>Pseudomonas</i>, <i>Aeromonas</i>, <i>Alishewanella</i>, <i>Vibrio</i>, glive pa smo uvrstili v rodove <i>Saccharomyces</i>, <i>Candida</i>, <i>Phoma</i>, <i>Coniothyrium</i> in druge. V modelih čistilnih naprav so ob koncu raziskave prevladoval bakterije iz sorodstva rodov <i>Halomonas</i> in <i>Comamonas</i>, prevladujoče glive ob teh vzorčenjih pa so bile iz rodov <i>Aureobasidium</i>, <i>Phaeosphaeria</i> in drugih. Z raziskavo smo dokazali, da je možno s pravilno pripravljenim vcepkom na povišano slanost prilagojenih mikroorganizmov bolj uspešno očistiti organsko onesnaženo slano vodo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 504.4:628.35(043.2)=163.6
CX inoculum for biological wastewater treatment/elevated salt concentration/salty wastewater/bacteria from salterns/fungi from salterns/biological wastewater treatment plant/activated sludge/flocculation/enrichment medium/NaCl/microbial community adaptation/16S rRNA/16S rDNA/18S rRNA/18S rDNA/TTGE
AU KOPRIVNIKAR, Monika
AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/LAPANJE, Aleš (co-supervisor)/PLEMENITAŠ, Ana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2008
TI DEVELOPMENT OF SALT TOLERANT INOCULUM FOR BIOLOGICAL TREATMENT OF WASTEWATERS WITH ELEVATED SALT CONTENT
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 93 p., 12 tab., 19 fig., 2 ann., 64 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Higher evaporation rate of water residues from the soil due to global warming elevate salt concentrations in terrestrial environment. Wastewater treatment process efficiency is drastically reduced when salt enriched waters from such soils and salted roads as well as marine waters enter into the sewage system and subsequently into the wastewater treatment plant. Accordingly, our aim was to prepare inoculums, containing consortia of microorganisms, adapted to elevated salt concentration conditions. We used an enrichment media with 1,5% NaCl for enrichment of desired microorganisms. We also compared wastewater treatment efficiency of microorganisms from salterns that are adapted to media conditions and those that are inoculated directly from salterns as we inoculated them into wastewater treatment plant models. We found adapted microorganisms to be most efficient. Molecular analysis gave us insight to bacterial and fungal community dynamics during the enrichment process. Filogenetic classification of chosen microorganisms, that showed successful adaptation to salty media, showed bacterial genera *Marinobacter*, *Halomonas* and *Idiomarina* and fungal genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Didymella* and *Acremonium* to be the most successful in salterns water inoculated salty media. Bacterial genera *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alishewanella*, *Vibrio* and fungal genera *Saccharomyces*, *Candida*, *Phoma*, *Coniothyrium* and some others were found to be the most successful in salty media, inoculated with activated sludge. Among microorganisms that showed successful reproduction in treatment plant models were bacteria, related to genera *Halomonas* and *Comamonas*, and fungi, related to *Aureobasidium*, *Phaeosphaeria* and some other genera. The results of our research showed that it is feasible using inoculum of enriched and salt adapted microorganisms for treatment of organically contaminated waters with elevated salt concentrations.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK	XI
1 UVOD IN NAMEN DELA	1
1.1 Uvod.....	1
1.1.1 Namen dela	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 Sol in živa bitja.....	4
2.2 Slana okolja	6
2.2.1 Sečoveljske soline	6
2.2.2 Organizmi v slanih in ekstremno slanih okoljih.....	8
2.3 Biološke čistilne naprave.....	14
2.3.1 Procesi v bioloških čistilnih napravah.....	15
2.3.2 Organizmi v bioloških čistilnih napravah.....	17
2.4 Prisotnost soli v bioloških čistilnih napravah in mikroorganizmi	21
2.5 Preučevanje sestave mikrobnih združb.....	25
2.5.1 Gojenje mikroorganizmov.....	25
2.5.2 Izolacija DNA iz vzorcev	27
2.5.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	27
2.5.4 Gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom (TTGE).....	28
2.5.5 Določanje nukleotidnega zaporedja fragmentov DNA in filogenetsko uvrščanje organizmov	29
3 MATERIAL IN METODE.....	30
3.1 Gojitvene tehnike.....	30

3.1.1 Bogatitev organizmov, odpornih na povišano koncentracijo NaCl.....	31
3.2 Molekularne tehnike	37
3.2.1 Izolacija deoksiribonukleinske kisline (DNA)	37
3.2.2 ANALIZA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB	39
3.2.3 ANALIZA GLIVNIH ZDRUŽB.....	42
3.2.4 Ekstrakcija in pomnoževanje fragmentov DNA izbranih lis, izrezanih iz poliakrilamidnega gela	44
3.3 Uporabljene kemikalije in oprema	44
3.3.1 kemikalije	44
3.3.2 Oprema	46
4 REZULTATI	48
4.1 Priprava vcepka in merjenje rasti mikroorganizmov.....	48
4.1.1 Rastne krivulje.....	48
4.1.2 Molekularna analiza združb v bogatitvah.....	51
4.2 Preizkus pripravljenega vcepka v modelu čistilne naprave (MČN)	65
4.2.1 Rastne krivulje.....	65
4.2.2 Rezultati testa BPK ₅ za vtoke in iztoke iz modelov čistilnih naprav	66
4.2.3 Molekularna analiza združb v modelih čistilnih naprav.....	68
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	73
5.1 Razprava	73
5.1.1 Priprava vcepka za čiščenje slane odpadne vode	73
5.1.2 Preizkus vcepka solinskih organizmov.....	81
5.2 Sklepi.....	84
6 POVZETEK	86
7 VIRI.....	88
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela 1: gojišča in vcepki v modelih čistilnih naprav	36
Tabela 2: program za pomnoževanje 16S rDNA pri bakterijah (Lapanje, 2005).....	40
Tabela 3: program za pomnoževanje glivne 18S rDNA.....	43
Tabela 4: filogenetska uvrstitev izbranih bakterij prvega solinskega vzorca, glede na nukleotidna zaporedja	55
Tabela 5: filogenetska uvrstitev izbranih bakterij tretjega solinskega vzorca, glede na nukleotidna zaporedja.....	57
Tabela 6: filogenetska uvrstitev izbranih bakterij združbe aktivnega blata, glede na nukleotidna zaporedja.....	59
Tabela 7: filogenetska uvrstitev izbranih gliv v solinskih vzorcih, glede na nukleotidna zaporedja.....	62
Tabela 8: filogenetska uvrstitev izbranih gliv v bogatitvah z vcepki aktivnega blata, glede na nukleotidna zaporedja.....	64
Tabela 9: izmerjena potreba po kisiku v vtoku in iztoku iz posameznega modela ter njegova učinkovitost čiščenja (4. do 8.9.2006).	67
Tabela 10: izmerjena potreba po kisiku v vtoku in iztoku iz posameznega modela ter njegova učinkovitost čiščenja (10. do 14.9.2006).	67
Tabela 11: filogenetska pripadnost izbranih bakterij v modelih čistilnih naprav, glede na nukleotidna zaporedja.....	70
Tabela 12: sorodstvo izbranih gliv iz modelov čistilnih naprav, glede na nukleotidna zaporedja.....	72

KAZALO SLIK

Slika 1: poenostavljena shema poteka dela	30
Slika 2: shema razporeditve solinskih vzorcev v različna gojišča.....	32
Slika 3: shema razporeditve vzorcev aktivnega blata v gojišča	33
Slika 4: shema modela čistilne naprave (Kosjek in sod., 2007)	35
Slika 5: modela C0 in IN1 ter podrobnejša slika modela IN2.....	36
Slika 6: spreminjanje optične gostote bogatitev, z vcepljenimi organizmi iz vode solin....	49
Slika 7: spreminjanje optične gostote bogatitev s predhodno obogatenimi solinskimi organizmi.	50
Slika 8: spreminjanje optične gostote v bogatitvah z vcepljenim aktivnim blatom z biološke čistilne naprave.	51
Slika 9: primer na UV-svetlobi slikanega agaroznega gela (po končani elektroforezi) z nanesenimi pomnoženimi fragmenti DNA, ki kodirajo del bakterijske 16S rRNA.....	52
Slika 10: analiza solinskih bakterijskih 16S rDNA fragmentov prvega solinskega vzorca z metodo TTGE.....	54
Slika 11: profili razporeditve solinskih bakterijskih 16S rDNA fragmentov združb tretjega solinskega vzorca z metodo TTGE.....	56
Slika 12: TTGE analiza bakterijskih 16S rDNA fragmentov združb aktivnega blata.....	58
Slika 13: pod UV-svetlobo slikan agarozni gel po elektroforezi z nanesenimi pomnoženimi glivnimi 18S rDNA fragmenti.....	60
Slika 14: rezultat TTGE analize 18S rDNA fragmentov solinskih glivnih združb iz bogatitev v gojiščih R2A in ART.....	61
Slika 15: TTGE profili združb gliv (18S rDNA) iz aktivnega blata, ki smo jih gojili v laboratoriju.	63
Slika 16: spreminjanje optične gostote v modelih čistilnih naprav.....	66
Slika 17: grafična ponazoritev učinkovitosti čiščenja v modelih v prvem in drugem merjenju BPK ₅	67
Slika 18: TTGE profili bakterijskih združb, ki smo jih gojili v modelih čistilnih naprav...	69
Slika 19: TTGE profili glivnih (18S rDNA) združb, ki smo jih izolirali iz modelov čistilnih naprav.	71

KAZALO PRILOG

Priloga A: Bakterijsko filogenetsko drevo

Priloga B: Glivno filogenetsko drevo

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BČN: biološka čistilna naprava

NaCl: natrijev klorid (kuhinjska sol)

BPK: biokemijska potreba po kisiku

RČN: rastlinska čistilna naprava

QS: quorum sensing.

OZ: oligonukleotidni začetnik

DNA: deoksiribonukleinska kislina

TTGE: gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom

TGGE: temperaturna gradientna gelska elektroforeza

DGGE: denaturacijska gradientna gelska elektroforeza

PCR: verižna reakcija s polimerazo

KPK: kemijska potreba po kisiku

dNTP: deoksinukleotid trifosfat. Sestavni deli verige DNA, ki jih polimeraza dodaja k oligonukleotidnemu začetniku v procesu PCR.

BSA: goveji serumski albumin

OG: optična gostota

16S rRNA: del prokariontske ribosomalne ribonukleinske kisline

18S rRNA: del evkariontske ribosomalne ribonukleinske kisline

16S rDNA: del prokariontske DNA, ki nosi zapis za 16S rDNA

18S rDNA: del evkariontske DNA, ki nosi zapis za 18S rDNA

MČN: model čistilne naprave

SLOVARČEK

VCEPEK ali **inokulum**: Manjši volumen z mikroorganizmi bogatega medija, ki je namenjen vcepitvi v gojišče.

GLIVE: heterotrofne organizme z večinoma hitinsko celično steno uvrščamo v posebno kraljestvo gliv.

BAKTERIJE: enocelični organizmi brez celičnega jedra (prokarionti), najbolj pogosto veliki okrog enega mikrometra. Celica je obdana s specifično zgrajeno celično steno, katere sestava se razlikuje med po Gramu pozitivnimi in negativnimi bakterijami.

AKTIVNO BLATO: mešanica odpadne vode in mikroorganizmov (bakterije, glive, praživali...), ki razgrajujejo organske snovi v odpadni vodi. Organizmi aktivnega blata lahko oblikujejo kosme in v taki obliki zelo uspešno čistijo odpadno vodo.

HALOTOLERANTNI MIKROORGANIZMI: mikroorganizmi, ki lahko rastejo v razmerah povišane koncentracije soli v okolju, vendar le-ta ni pogoj za njihovo rast.

HALOFILNI MIKROORGANIZMI: mikroorganizmi, ki za rast potrebujejo visoke koncentracije soli v svojem okolju.

BIOLOŠKA ČISTILNA NAPRAVA: čistilna naprava, v kateri odpadno vodo čistijo mikroorganizmi z naravnimi procesi razgradnje organskih snovi.

GOJIŠČE: mešanica snovi, ki omogočajo rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Gojišče je lahko definirano in ima natančno določeno kemijsko sestavo, lahko pa je kompleksno in vsebuje sestavine biološkega izvora, na primer mlečni, krvni in mesni ekstrakt.

BOGATITVENO GOJIŠČE (BOGATITEV): gojišče, ki ima dodano snov, ki jo samo nekateri mikroorganizmi lahko tolerirajo ali celo uporabljajo. Bogatitveno gojišče za bogatitev halofilnih mikroorganizmov ima dodano sol.

OZMOZA ali **osmoza**. Prehod topila (na primer vode) skozi polprepustno membrano v smeri višje koncentracije topljencev, ki jih membrana ne prepušča.

HIPERTONIČNO OKOLJE: okolje z višjo koncentracijo delcev v raztopini, kot je njihova koncentracija na notranji strani membrane celice, organizma itd., ki je v takem okolju.

HIPOTONIČNO OKOLJE: okolje, kjer je v raztopini manjša koncentracija delcev, kot na notranji strani membrane celice, organizma itd., ki je v takem okolju.

METANOGENEZA: proizvodnja metana z metanogenimi mikrobi. Prisotnost kisika zavira proizvodnjo metana, končni prejemnik elektronov v tem procesu namreč ni kisik, ampak ogljik. Vir tega pa sta lahko ogljikov dioksid ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$), očetna kislina ($\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$) in nekatere druge organske snovi (metanol, metilamin, metantiol...). Ta proces je zadnja stopnja razpada organskega materiala.

ANAMOKS: oksidacija amonija do plinskega dušika s pomočjo nitrata kot končnega prejemnika elektronov.

NITRIFIKACIJA: dvostopenjski proces oksidacije amonija do nitrata. Prva stopnja je nitritacija, s produktom nitritom, drugi korak pa je oksidacija nitrita do nitrata ali nitratacija.

VODNA AKTIVNOST: pomeni dostopnost vode za organizme. Definirana je kot razmerje med pritiskom vodne pare vode v danih pogojih in pritiskom vodne pare čiste vode pri določeni temperaturi. Čista destilirana voda ima vodno aktivnost 1.

TURGOR ali turgorski pritisk: Pritisk tekočine v notranjosti celice na celično steno. Povezan je z ozmozo, saj se v primeru povečanega prehajanja vode v celico poveča, v primeru uhajanja vode iz celice pa se zmanjša.

AEROBNE RAZMERE: prisotnost kisika v okolju.

ANAEROBNE RAZMERE: odsotnost kisika v okolju.

MINERALIZACIJA: proces, v katerem se organske snovi pretvorijo v anorganske.

BIOFILM: na živo ali neživo podlago pritrjena plast združenih mikroorganizmov in njihovih zunajceličnih produktov.

KOSEM ali flokul: skupek delcev, ki plavajo v tekočini. V primeru čiščenja odpadne vode so to v plavajočem skupku združeni mikroorganizmi. Po sestavi je lahko podoben biofilmu, ni pa pritrjen na podlago. V notranjosti zrelega kosma so navadno anaerobni pogoji, zato tam živijo mikroorganizmi, ki lahko opravljajo procese tudi v odsotnosti kisika, na primer anamoks. Združevanje mikroorganizmov v kosme je zelo zaželeno v procesu čiščenja odpadne vode, saj se učinkovitost čiščenja zelo izboljša, hkrati pa se s kosmičenjem in usedanjem zrelih kosmov na dno bazenov zmanjša število razpršenih mikroorganizmov, ki bi lahko uhajali iz čistilne naprave.

QUORUM SENSING: zaznavanje gostote celic in komuniciranje med bakterijskimi celicami.

OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIK (OZ): kratka nukleotidna veriga, ki se uporablja pri pomnoževanju odsekov DNA. Zaporedje verige OZ je obratno komplementarno z enako dolgim nukleotidnim zaporedjem na verigi DNA. Za pomnožitev odseka DNA se uporabi dva OZ, od katerih se eden ujema z zaporedjem na 5' koncu, drugi pa na 3' koncu želenega odseka.

DNA POLIMERAZA: encim, ki je potreben pri podvojevanju DNA. Ta encim katalizira sintezo DNA iz deoksiribonukleotidov, ki jih niza v obratno komplementarno verigo tisti, katere podvajanje poteka. Za začetek nizanja nukleotidov mora biti na verigi že pripet OZ. Polimeraza *Taq* je je termostabilna DNA polimeraza, ki se pogosto uporablja v PCR.

POLIAKRILAMIDNI GEL: tanek film polimerizirane oblike akrilamida, ki ima mrežasto strukturo, v katero se v procesu elektroforeze ujamejo kratki odseki DNA.

NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE: zaporedje nukleotidnih baz v verigi DNA ali RNA.

OPTIČNA GOSTOTA: razmerje med svetlobo, ki prepotuje skozi medij in svetlobo, ki se v gojišču absorbira pri določeni valovni dolžini.

VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO: metoda, s katero pomnožujemo določen odsek DNA v encimatski reakciji, navadno z encimom polimeraza *Taq* iz bakterije *Termophilus aquaticus*. Reakcija poteka v 20 do 40 ciklih časovno določenega spreminjanja temperature, v katerih se pomnožuje DNA.

1 UVOD IN NAMEN DELA

1.1 Uvod

Biološko čiščenje odpadne vode je eden od najpomembnejših biotehnoloških procesov v uporabi (Daims in sod., 2006). Temelji na naravnih procesih, ki prispevajo h kroženju snovi in pretoku energije na Zemlji. Mikroorganizmi, ki čiščenje opravljajo, so lahko predmet raziskav področij, ki preučujejo procese v naravi. Preko njih lahko dobimo vpogled v kompleksnost, funkcije in raznolikost niš mikroorganizmov, prav tako pa tudi v dogajanja v mikrobnih združbah na nivoju sestave populacije in na genetskem nivoju.

Čiščenje odpadne vode v bioloških čistilnih napravah z razpršeno biomaso temelji na razgradnji organskih snovi s pomočjo mikroorganizmov aktivnega blata. Mikroorganizmi z razgradnjo teh snovi pridejo do energije za svojo rast in razmnoževanje, pri tem pa organske snovi iz vode pretvorijo v različne produkte (CO_2 , CH_4 , alkoholi...), odvisno od zunanjih razmer (prisotnost ali odsotnost kisika...), in v lastno biomaso.

V optimalnih razmerah za mikroorganizme aktivnega blata, poteka razgradnja organskih snovi zelo uspešno, navadno jih odstranijo več kot 90 odstotkov. V primeru nenadne povišane koncentracije soli v odpadni vodi pa razmere za večino organizmov aktivnega blata postanejo neugodne. Povišana koncentracija soli zavira procese mikrobne razgradnje (Lefebvre in sod., 2007), nekatere vrste mikroorganizmov pa ob vdoru soli celo odmrejo. Posledično je zmanjšana učinkovitost odstranjevanja organskih snovi iz odpadne vode.

Problem nenadne povišane koncentracije soli v odpadni vodi se lahko pojavi zaradi soljenja cest v zimskem času, vdora morske vode v kanalizacijske cevi, industrijskih izpustov slane vode in podobnega. V večini primerov lahko to povišanje predvidimo. Sol se v različno visokih koncentracijah pojavlja v 5 odstotkih odpadnih voda po svetu (Lefebvre in sod., 2007). Uspešna priprava vcepka z organizmi, ki jim slana odpadna voda predstavlja optimalne razmere, lahko predstavlja rešitev ali vsaj delno pomoč v mnogo primerih motenega delovanja bioloških čistilnih naprav.

Nekateri mikroorganizmi so na življenje v (ekstremno) slanih okoljih prilagojeni. To so halotolerantni (lahko rastejo v prisotnosti soli) ali haloofilni (potrebujejo prisotnost soli za rast) organizmi. Primer okolja, kjer najdemo take mikroorganizme, so tudi soline, ki so bile zgrajene za pridobivanje soli. V takem ekstremno slanem okolju so lahko koncentracije NaCl od 3 do 35 odstotkov (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

Halotolerantni organizmi, ki jih najdemo tudi v okolju brez soli, so se sposobni prilagoditi na povišano koncentracijo soli (Lefebvre in sod., 2007), če je višanje koncentracije postopno ali če je združba daljši čas izpostavljena povišani slanosti. Sestava združbe se

postopno spreminja, vedno bolj prevladujejo organizmi, ki so odporni na povišano slanost, vedno manj je tistih, ki jim sol predstavlja zaviralni dejavnik rasti in razmnoževanja.

Za čiščenje zelo slane odpadne vode v mnogo primerih, zaradi odmiranja neprilagojenih mikroorganizmov, uporabljajo le fizikalno-kemijske postopke (Lefebvre in Moletta, 2006). Tako čiščenje zahteva uporabo kemikalij, kar je z vidika varstva okolja vprašljivo, hkrati pa taki postopki povišajo stroške čiščenja. Zato potekajo raziskave v smeri uporabe naravnih postopkov tudi za čiščenje odpadne vode, ki vsebuje visoko koncentracijo NaCl ali drugih soli.

1.1.1 Namen dela

Z raziskavo smo želeli pripraviti vcepek prilagojenih mikroorganizmov, ki bi v primeru povišanja koncentracije soli v odpadni vodi, ki teče v biološko čistilno napravo (BČN), nadaljevali razgradnjo organskih snovi. Te mikroorganizme bi lahko vnesli v BČN tik pred predvidenim povišanjem slanosti, ali pa sočasno s povišanjem koncentracije soli. Ker za te organizme povišana slanost ne bi predstavljala stresa, bi odstranjevanje organskih snovi potekalo naprej nemoteno ali z minimalnim odstopanjem od normalnih rezultatov delovanja BČN.

Za pridobitev primerno prilagojenega mikrobnega vcepka, smo organizme iz solin in iz aktivnega blata BČN bogatili v gojiščih z dodatkom 1,5 odstotka NaCl. Taka koncentracija soli nastane v čistilnih napravah ob vdoru slane vode v kanalizacijske cevi. Opazovali smo razvoj treh združb mikroorganizmov iz ekstremno slane vode Sečoveljskih solin in organizme dveh vzorcev aktivnega blata iz koprške BČN. Pričakovali smo, da se bosta združbi postopno prilagajali na nove razmere, in sicer združba iz solin na povišano koncentracijo organskih snovi, združba aktivnega blata pa na povišano koncentracijo NaCl. V časovnih presledkih smo jemali vzorce iz bogatitev, da bi ugotovili v kakšnem času se združbe stabilizirajo in jim dodatek svežega gojišča ne predstavlja več dejavnika, ki povzroči veliko spremembo v številu razpršenih mikroorganizmov. Po stabilizaciji naj bi v združbi mikroorganizmov prevladovale vrste, ki jim slana odpadna voda predstavlja ugodne razmere za rast in razmnoževanje (ob tem pa seveda iz svojega okolja odstranjujejo organske snovi, ki jih za to potrebujejo). Z nadaljnjimi genetskimi analizami smo natančneje ugotavljali, kateri organizmi so bili glavni predstavniki končne, na nove razmere prilagojene združbe.

Zaradi pomembne vloge teh organizmov pri procesih v BČN, smo se osredotočili na preučevanje bakterijskih in glivnih združb ter njihovo spreminjanje v procesu prilagajanja na razmere slane odpadne vode.

Ker smo želeli preveriti tudi učinkovitost halotolerantnih in halofilnih organizmov v procesu čiščenja slane odpadne vode, smo vcepili organizme iz solin brez predhodnega

prilagajanja in organizme iz solin, ki smo jih predhodno bogatili v slanih gojiščih, v pomanjšane modele čistilnih naprav in preučevali razvoj združb tudi tam. V vseh modelih smo merili tudi učinkovitost odstranjevanja organskih snovi. S tem smo želeli ugotoviti, kakšne so razlike v učinkovitosti čiščenja z organizmi, ki se še prilagajajo na nove razmere (več organskih snovi) in tistimi, ki so na take razmere že prilagojeni.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Sol in živa bitja

Kuhinjska sol ali natrijev klorid (NaCl), je zelo pomembna, tako za človeka, kot tudi za vsa druga živa bitja. Ponekod so jo ljudje uporabljali kot plačilno sredstvo, zdravilo in sredstvo za konzerviranje. Danes se uporablja pri izdelavi približno štirinajst tisoč izdelkov (barvne tkanine, papir...), pozimi pa z njo posipajo ceste proti zamrzovanju (Bratož, 2007), saj zniža ledišče vodi. Nepogrešljiva pa je tudi kot začimba.

Že dolgo je znano, da sol zavira procese propadanja mesa in drugih živil, torej je naravni konzervans. V časih, ko ni bilo možnosti zamrzovanja živil, so s soljenjem in sušenjem mesa upočasnili procese propadanja zaradi mikrobne aktivnosti. Tudi danes uporabljamo sol za sušenje surovih mesnih izdelkov, saj ima pomembno vlogo, ne samo pri okusu, aromi in teksturi takih mesnin, ampak služi tudi za preprečevanje pretirane mikrobne naselitve in procesov gnitja. Protimikrobno delovanje soli se že dolgo uporablja tudi v usnjarski industriji (Lefebvre in sod., 2007), kjer ima vlogo preprečevanja gnitja svežih kož v začetni fazi strojenja.

NaCl je nepogrešljiv vir mineralov in sodeluje pri uravnavanju količine vode v telesu ter tako omogoča normalno delovanje organov. Natrij je glavni kation, klor pa glavni anion telesne medceličnine. Natrij je del pomembne natrij-kalijeve črpalke v membranah, sodeluje pri regulaciji krvnega pritiska, je pomemben mineral kosti, klor je del želodčne kisline, pomemben je za ravnotežje elektrolitov, oba pomembno vplivata na volumen telesnih tekočin (Jeršek in Jeršek, 2008) in imata še mnogo drugih funkcij v telesu. Pomembno je tudi pufrsko delovanje soli (uravnavanje pH).

Taka ali drugačna vrsta soli je pomembna za vse organizme, saj se povsod v živem svetu pojavlja neke vrste razmerje elektrolitov med zunanostjo in notranostjo celic, organov, organizmov, ki omogoča njihovo delovanje v danem okolju. Organizmi imajo tudi različne razpone tolerance slanosti, saj večja koncentracija soli pomeni manj dostopne vode. Voda pa je medij za vse presnovne (metabolične) reakcije, ki omogočajo življenje (Zupančič in sod., 2002). Razmerje med količino soli in količino vode v organizmu je odvisno tudi od prilagoditev živega bitja na okolje, v katerem živi. Organizmi, ki so prilagojeni na slano ali sušno okolje, imajo mehanizme, ki preprečujejo pretirano izgubo vode. Nekateri so sposobni preživeti visoke koncentracije soli in s tem nižji delež vode, vsaj za krajši čas.

Živali imajo za vzdrževanje vode v telesu različne mehanizme v vseh organskih sistemih, kjer bi lahko prišlo do izgub (dihala, prebavila, izločala, koža...). Celice v večceličnih organizmih so zelo odvisne od količine vode v okolici (medceličnini...), saj večinoma (bolj ali manj) pasivno oddajajo in sprejemajo vodo. Če je zunanost celice bolj slana od notranosti, pride do oddajanja vode, ob večjem deležu vode v zunanosti pa pride do

vdiranja vode v celico in nabrekanja (Zupančič in sod., 2002). Če je razlika v koncentraciji prevelika (v okolici je premalo soli), celica počí, saj vanjo vdre preveč vode, zaradi zakonitosti ozmoze. Okolje celic v večceličnih organizmih je navadno (v razmerah blizu optimalnih za organizem) dobro ozmotsko regulirano, zato ne prihaja do množičnega propada celic zaradi nabrekanja ali izsuševanja. To velja za večcelične organizme, ki živijo v različnih (sušnih, slanih, vodnih...) okoljih in so na tako okolje prilagojeni.

Enocelični organizmi pa so s celotno površino v stiku z zunanjim okoljem. Le-to je lahko glede vode hipotonično (raztopljenih delcev je manj, kot v celici), ali pa hipertonično (raztopljenih delcev je v okolju več, kot v celici). Organizme najdemo v celém spektru koncentracije soli, od sladkih voda do zelo slanih okolij (Oren, 2002). V primeru hipotoničnega ali hipertoničnega okolja potrebujejo organizmi mehanizme, ki preprečujejo prevelik vdor ali izgubo vode. Taki mehanizmi lahko pri večini organizmov le v določenih mejah preprečujejo propad celic. Nad in pod mejnimi koncentracijami soli v okolju pa postanejo razmere uničujoče, propad celic je neizogiben. Prav meje za koncentracije soli, ki jih organizem še prenese, so za različna bitja različne. V tem diplomskem delu smo obravnavali okoliščine, kjer je slanost povišana, torej so to za večino organizmov hipertonične razmere. Za nekatere organizme pa je prav tako okolje, zaradi njihovih prilagoditev, optimalno in v njem zelo dobro uspevajo. Drastično znižanje koncentracije soli vodi v njihov propad. Podrobnejši opis mehanizmov halofilnih organizmov za premagovanje ekstremnih ozmotskih razmer in ostale značilnosti teh organizmov so opisane v naslednjih poglavjih.

Natrijev klorid vpliva na lipidno dvoplastno celično membrano, saj zmanjša lateralno samodifuzijo membranskih lipidov, zmanjša mobilnost membrane z vezavo natrijevih ionov na lipide in s tem tvorbo večjih kompleksov, vpliva na zgostitev membrane in njen elektrostatski potencial. Navadno so biološke membrane obdane z raztopino, ki vsebuje Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} in Cl^- ione, katerih koncentracija je različna znotraj in zunaj celice. Interakcije med ioni in lipidnimi molekulami v membrani so pomembne za transport preko membrane in za ostale procese, ki se odvijajo na tem prehodu med celico in njenim okoljem. Na transport preko membrane vpliva tudi temperatura. Raziskava je pokazala, da se čas prehoda delca preko membrane manjša z višanjem temperature in z nižanjem ionske moči. NaCl torej močno spremeni strukturne in dinamične lastnosti lipidnega dvosloja (Böckmann in sod., 2003).

Nekatere antimikrobne snovi (na primer rastlinska eterična olja, alifatski aldehidi, primarni alkoholi) v razmerah brez prisotnosti soli (skoraj) nimajo zaviralnih učinkov na mikrobo rast. V prisotnosti soli pa se, zaradi kombinacije vplivov obeh snovi, lahko pokaže zaviralen učinek že pri precej nizki koncentraciji. Tudi za zaviralne učinke soli velja podobno, saj same (tudi zelo) slane razmere dovoljujejo rast mnogim mikroorganizmom, medtem ko se v kombinaciji z eteričnimi olji zaviralni učinki soli pokažejo pri precej nižji koncentraciji. Eterična olja, ki imajo v kombinaciji s soljo zaviralne učinke na mikrobo

rast, so lahko uporabna v prehrabni industriji kot konzervansi, saj je v mnogih živilih dovolj soli, da so antimikrobni učinki takih rastlinskih eteričnih olj dovolj močni (Kurita in Koike, 1982).

2.2 Slana okolja

Slana in zelo slana okolja navadno nastanejo z izhlapevanjem morske vode in koncentriranjem soli. Taka okolja lahko nastanejo naravno, zaradi izhlapevanja iz naravno omejenega dela morja ali pa so posledica tega, da je človek ogradil del morja, z namenom pridobivanja morske soli (soline).

Slane vode, ki nastanejo z izhlapevanjem morske vode, imajo navadno podobno sestavo kot morska voda, s prevladujočima ionoma, natrijevim in kloridnim, pH pa je blizu nevtralnega, ali pa rahlo v bazičnem območju (Oren, 2002). Značilnosti vode v solinskih bazenih pa je višja vsebnost soli kot v morski vodi in spreminjanje koncentracije soli, od 3-odstotne do 35-odstotne skozi sezono pridobivanja soli. Pomembni dejavniki v solinah pa so tudi nizka nasičenost vode s kisikom, močno sončno sevanje in občasno precejšnja dostopnost hranil (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

V procesu izhlapevanja morske vode prihaja tudi do sprememb ionske sestave zaradi obarjanja kalcita in sadre ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ter drugih mineralov (Gunde-Cimerman, in sod., 2000; Oren, 2002). Na koncu je v solinskih bazenih največ oborine halita oz. NaCl (preko 30 odstotkov) (Gunde-Cimerman in sod., 2000), kar je tudi cilj solinarstva. Znak za začetek kristalizacije soli je rdeča obarvanost na gladini solinskih bazenov, ki jo povzroči množično pojavljanje pigmentiranih fototrofnih bakterij (Gunde-Cimerman in sod., 2000; Oren, 2002).

Nekatera zelo slana okolja imajo ionsko sestavo, ki se zelo razlikuje od običajne ionske sestave morske vode. Primer je Mrtvo morje, z visoko vsebnostjo dvovalentnih kationov (Mg^{2+} in Ca^{2+}) v primerjavi z monovalentnimi (Na^+ in K^+). Vrednost pH pa je v kislem območju (Oren, 2002).

2.2.1 Sečoveljske soline

Slovenske Sečoveljske (Piranske) soline so leta 1989 postale Krajinski park. Leta 1993 so bile zaradi svoje krajinske in ekološke vrednosti uvrščene na seznam ramsarskih lokalitet, ki so pod UNESCO-vo zaščito (Križan in Vidmar, 2004). Obsegajo površino približno 850 hektarov in imajo za sabo pestro zgodovino. Ustanovljene so bile leta 1274 pod beneško republiko (Gunde-Cimerman in sod., 2000), kasneje pa so bile v lasti francoskega in avstrijskega cesarstva, Italije, Jugoslavije in Slovenije. Del solin je bil v koncu šestdesetih

let opuščen in prepuščen naravnemu preoblikovanju (Križan in Vidmar, 2004), iz česar je nastal raznolik ekosistem. Tu je danes tudi muzej solinarstva.

V Sečoveljskih solinah pridelujejo sol na tradicionalen, tisočletja star način, zato spadajo med najodličnejše evropske soline (Bratož, 2007). S šestnajst zaporednimi solinskimi (izparilnimi in kristalizacijskimi) bazeni različnih velikosti (50 x 100 m, 10 x 20 m in 100 x 200 m), ki so na sredini globoki 5 do 10 cm in ločeni s kanali (globokimi 30 cm), dosežejo različno slanost vode. Sezona intenzivnejšega izhlapevanja vode traja od maja do oktobra. Glavna sestavina soli iz teh solin je NaCl, precej pa je tudi magnezijevega klorida ($MgCl_2$) (Gunde-Cimerman in sod., 2000). V kulinariki najbolj cenjena oblika soli, s posebno aromo, ki jo pridelujejo tudi v Piranskih solinah, je solni cvet, kakor imenujemo sol, ki se v tankem sloju nabere na površini vode solnih bazenov (Bratož, 2007).

Sečoveljske soline so bogate tudi z živalskimi in rastlinskimi vrstami, ki so naselile še posebej predele, kjer je bila opuščena solinarska dejavnost. Rastline slanih tal, slanuše ali halofiti, so z raznimi mehanizmi prilagojene na nizko vsebnost vode v okolju. Na območju Piranskih solin rastejo obmorska rupija (*Ruppia maritima*), navadni osočnik (*Salicornia herbacea*), lobodovec (*Halimione portulacoides*), sodina solinka (*Salsola soda*), morski koprc (*Crithmum maritimum*), ozkolistna mrežica (*Limonium angustifolium*) in druge. 45 vrst rastlin s tega območja je na seznamu ogroženih rastlin Slovenije. Od živali, ki živijo na tem območju, so na zelo slano okolje najbolj prilagojeni solinski rakci (*Artemia salina*), nekatere školjke, mnogoščetinci in ribice solinarke (*Alphanius fasciatus*). Ostale živali pa so bolj ali manj prilagojene na slane razmere. Tu živi tudi etruščanska rovka (*Suncus etruscus*), ki je najmanjši sesalec, primorska kuščarica (*Lacerta sicula*) in ostrouhi netopir (*Myotis blythi*). Največji delež vretenčarskih predstavnikov na območju solin pa predstavljajo ptice, ki imajo dobre razmere za življenje, zaradi ugodne klime in obilice hrane. Območje Sečoveljskih solin obiskuje 200 vrst ptic, 80 vrst pa jih tu tudi gnezdi (vsaj občasno). Mala bela čaplja (*Egretta garzetta*) je zelo pogosto opažena ptica v solinah in je tudi simbol Krajinskega parka Sečoveljske soline, sicer pa so tu pogosto tudi druge čaplje (siva čaplja (*Ardea cinerea*), rjava čaplja (*Ardea purpurea*), čopasta čaplja (*Ardeola ralloides*)), galebi, race, gosi, prodniki, martinci. Redkeje pa tu gnezdijo rdečenogi polojnik (*Himantopus himantopus*), rumenonogi galeb (*Larus cachinnans*), beločeli deževnik (*Charadrius alexandrinus*), navadna čigra (*Sterna hirundo*) in mala čigra (*Sterna albifrons*) (Križan in Vidmar, 2004).

Nekaj omenjenih rastlin in živali je sposobnih živeti v zelo slanem okolju, vendar je večina prilagojena na razmere na območju solin, ki niso ekstremno slane. Ptice, ki jih je med živalskimi vrstami največ na tem območju, večinoma ne potrebujejo posebnih prilagoditev na višjo vsebnost soli, na posebne ozmotske razmere pa morajo biti prilagojene živali, ki živijo v bazenih, kjer slanost doseže zelo visoke vrednosti. Taka žival je solinski rakec, ki je tudi pomembna hrana tamkajšnjih ptic. Rastline, ki rastejo na slanih tleh, so se prilagodile s sposobnostjo izločanja soli s solnimi žlezami in drugimi mehanizmi

ohranjanja stabilnega notranjega okolja. V samih bazenih solin, kjer je slanost ob vrhuncu kristalizacije soli ekstremna, je vrstna pestrost živali in rastlin precej majhna. Pri teh razmerah preživijo skoraj izključno le mikroorganizmi, katerih pestrost je presenetljivo velika (Oren, 2002).

2.2.2 Organizmi v slanih in ekstremno slanih okoljih

Ekstremno slana okolja so za večino organizmov daleč od optimalnih življenjskih razmer. Le redka živa bitja so sposobna živeti in se celo zelo uspešno razmnoževati v takem okolju. Znano je, da so se mikroorganizmi sposobni prilagoditi na ekstremne slanosti in pH vrednosti, kakršne vladajo v nekaterih alkalnih slanih jezerih v Afriki, Indiji in na Kitajskem, kjer pH vrednosti lahko celo presežejo 11, koncentracija soli pa je lahko višja od 30 odstotkov.

Odkritje anaerobne halo- in termofilne bakterije *Halothermothrix orenii* je privedlo do spoznanja, da so mikroorganizmi sposobni živeti celo v okoljih, kjer istočasno vladajo visoke temperature (68°C) in koncentracije soli do 20 odstotkov (Oren, 2002). Zato ni nič nenavadnega, če najdemo pestro mikrobno življenje tudi v slani vodi solin. Pestrost halofilnih in halotolerantnih mikroorganizmov se kaže na filogenetskem (arheje, bakterije, evkarionti) in fiziološkem nivoju (Oren, 2002).

Čeprav poznamo gojljive solinske mikroorganizme že precej časa, šele v zadnjih letih dobivamo boljši vpogled z molekularnimi tehnikami, ki omogočajo bolj realno sliko raznolikosti življenja teh okolij. Danes vemo, da ta okolja naseljujejo halofilni organizmi, kot so alge, praživali, arheje, bakterije in (kot so pokazale nedavne raziskave) tudi pestre glivne združbe (Gunde-Cimerman in sod., 2000).

Glavnino mikrobne biomase ekstremno slanih okolij predstavljajo **aerobne halofilne arheje** (družina Halobacteriaceae), ki so tudi odgovorne za večino rdeče obarvanosti slanih bazenov, ob 30-odstotni koncentraciji soli (Oren, 2002). Rdeča barva je posledica prisotnosti karotenoidov v membranah teh organizmov in povzroči višjo absorpcijo sončne svetlobe ter s tem pospeši izhlapevanje vode. Pomembne pa so še metanogene halofilne arheje iz skupine Euryarchaeota, ki lahko metanogenezo opravljajo pri razmerah popolne nasičenosti z NaCl (Oren, 2002).

Med **bakterijami**, za katere se še ne dolgo nazaj ni vedelo, da lahko živijo v ekstremno slanih okoljih, je veliko halofilnih in halotolerantnih organizmov, ki se pojavljajo razpršeni v mnogih filogenetskih podskupinah (Proteobacteria, Cyanobacteria, po Gramu pozitivne bakterije). V skupini halofilnih bakterij je večina sposobna živeti v zmerno slanih razmerah, ne pa v zelo ekstremnih okoljih. So pa tudi izjeme (*Halorhodospira*, *Actinopolyspora halophila*, *Salinibacter*), ki so po zahtevah in toleranci slanosti podobne halofilnim arhejam (Oren, 2002). K tvorbi trdne mikrobne podlage v solinskih bazenih v

največji meri prispevajo ekstremno halofilne fototrofne cianobakterije vrste *Microcoleus chthonoplastes* (Gunde-Cimerman in sod., 2000; Grimalt in sod., 1992). Presenetljiva je tudi pestrost kemolitoavtotrofnih bakterij, ki so sposobne oksidirati žveplo v slanem okolju. Med njimi so zmerno in ekstremno halofilne aerobne bakterije, anaerobni ekstremno in zmerno halofilni denitrifikatorji, ki oksidirajo tiosulfat, ter organizmi, ki uporabljajo tiocianat kot substrat; vsi pa pripadajo skupini Gammaproteobacteria (Sorokin, 2007). Ugotovili so, da število ekstremno halofilnih bakterij z naraščanjem slanosti narašča, medtem ko število vrst (pestrost združbe) upada. Optimalna slanost za razmnoževanje takih bakterij je med 20 in 25 odstotki NaCl (Antón in sod., 2000).

Za **evkariontske** predstavnike solinske vode je še pred nekaj leti veljalo, da so redki. Med glavnimi predstavniki je zelena alga *Dunaliella* z več vrstami, ki se pojavlja skoraj v vseh zelo slanih okoljih. Najbolj znana vrsta je *D. Salina* (Butinar in sod., 2005). V Mrtvem morju in nekaterih drugih slanih jezerih in solinah je ta alga glavni primarni producent (Oren, 2002). Od živalskih predstavnikov ima zelo pomembno vlogo v solinah *Artemia* ali solinski rakec, ki je omenjen že v poglavju o Sečoveljskih solinah.

Po odkritju presenetljivo velike pestrosti halofilnih gliv v solinah se je izkazalo, da evkariontsko življenje solin še zdaleč ni revno, ampak prav nasprotno. Pred tem so bile halofilne glive opisane le v zvezi z živili in kot prebivalci zmerno slanih okolij (slana močvirja, slana prst, morska voda), ne pa tudi zelo slane vode solin. Med glivami, ki so sposobne živeti in se razmnoževati v solinski vodi, so najpomembnejše črnim kvasovkam podobne glive, ki imajo debele melanizirane celične stene (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Raziskave te skupine organizmov so se začele prav v Sečoveljskih solinah. Glive živijo v razponu slanosti od 3 do 35 odstotkov NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2000; Butinar in sod., 2005). Kasneje so bile te glive izolirane iz ekstremno slane vode na treh kontinentih, zato vse kaže na njihovo globalno prisotnost (Butinar in sod., 2005). Zaradi velikega razpona slanosti skozi sezono, so lahko spremljali pojavljanje gliv v solinah v odvisnosti od koncentracije soli, spreminjala se je tudi količina dušika in fosforja, nasičenost s kisikom pa je tudi zelo povezana s slanostjo, saj se raztapljanje kisika v vodi manjša z zviševanjem slanosti. Pri najvišjih vrednostih koncentracije soli so lahko melanizirane glive predstavljale 85 do 100 odstotkov gliv, z nižanjem slanosti pa so jih nadomeščale nemelanizirane glive (Butinar in sod., 2005). Glavni predstavniki so vrste *Hortaea werneckii*, *Phaeotheca triangularis*, *Trimmatostroma salinum*, *Aureobasidium pullulans* in rod *Cladosporium* (Butinar in sod., 2005; Gunde-Cimerman in sod., 2000).

2.2.2.1 Odzivi mikroorganizmov na ozmotski stres

Mikroorganizmi, ki živijo v okolju z nizko vodno aktivnostjo, morajo imeti posebne prilagoditve na take razmere. Prav vodna aktivnost je dejavnik, ki najbolj vpliva na mikrobno aktivnost v ekstremnih okoljih, kakršna so zelo hladna (sneg, morski led,

ledeniški led, permafrost) (Gunde-Cimerman in sod., 2003) in zelo slana okolja. Ker je voda nujno potrebna za življenje, je zelo pomembno, da je organizmom dostopna. Če je biološko dostopne vode zelo malo, lahko tako okolje štejemo za ekstremno, v njem pa lahko živijo in se razmnožujejo le ekstremofilni organizmi s svojimi prilagoditvami. Zaradi prepustnosti bioloških membran za vodo, morajo organizmi ohranjati citoplazmo vsaj izoozmotsko, oziroma rahlo hiperozmotsko, v primerjavi z okoljem, da ohranijo turgorski pritisk v notranjosti celice. Za doseg tega pa organizmi poznajo več različnih mehanizmov. Pri vseh znanih primerih organizmov v slanih okoljih se pojavlja izločanje natrijevih ionov (Na^+) iz citoplazme z aktivnim transportom, čeprav mora celica ohranjati citoplazmo hipertonično glede na okolje, da se ohrani turgorski pritisk. Ni znano zakaj so natrijevi ioni tako škodljivi za celico, da jih vsi halofilni organizmi aktivno izločajo (Oren, 2002). Vendar pa je črpanje Na^+ in H^+ preko membrane zelo povezano tudi z regulacijo pH v citoplazmi (Kurz in sod., 2006). Organizmi slanih okolij so morali razviti mehanizme, s katerimi ob vzdrževanju nizke koncentracije natrijevih ionov v celici vseeno dosegajo dovolj visok ozmotski pritisk v citoplazmi. Razvili so dve osnovni strategiji za doseganje tega stanja. Ena je koncentriranje kalijevih (K^+) in kloridnih (Cl^-) ionov v celici. Ta mehanizem uporablja večina aerobnih halofilnih arhej. Z njim vzdržujejo vsaj tako visoko koncentracijo kalijevega klorida (KCl) v citoplazmi kot je koncentracija NaCl v njihovem okolju. Prednost te strategije je v majhni porabi energije, slabost pa, da je zaradi visoke koncentracije KCl v citoplazmi potrebna prilagoditev vseh znotrajceličnih proteinov (Oren, 2002). Pri tako visoki slanosti v celici, bi se encimi brez prilagoditev obarjali iz raztopine. Ugotovili so, da imajo encimi pri teh organizmih na površini negativni naboj, ki privlači vodo v obliki kalijevih (K^+) in natrijevih (Na^+) hidratov (Dyall-Smith in Danson, 2001). Druga strategija prilagajanja na visoko slanost pa je izločanje soli iz celice, namesto soli pa organizmi za ohranitev ozmotskega ravnovesja sintetizirajo ali privzemajo v citoplazmo kompatibilne organske topljence. To so lahko glicerol, trehaloza, aminokisline in njihovi derivati ter preprosti sladkorji (Oren, 2002). Bakterije in evkarionti običajno kopičijo nevtralne organske topljence, arheje pa negativno nabite snovi (Roberts, 2005). Ta strategija je bolj razširjena med ekstremofili kot prva. Nekatere halofilne metanogene arheje verjetno uporabljajo kombinacijo obeh strategij, saj so v njih našli organske topljence prav tako pa tudi visoke koncentracije KCl (Oren, 2002). Njihovi celični proteini pa so kazali nekaj prilagoditev na povišano koncentracijo ionov v celici (Oren, 1999). Tudi prilagoditev s kopičenjem kompatibilnih organskih topljencev ima prednosti in slabosti, saj je sinteza organskih topljencev energetsko potraten proces, vendar pa ta način ne zahteva toliko prilagoditev beljakovin (Oren, 2002). Kompatibilni topljenci, na primer holin, glicin betain in karnitin, imajo vlogo stabilizatorja proteinov in lipidov (Robert in sod., 2000). V prisotnosti molarnih koncentracij organskih topljencev lahko normalno delujejo tudi običajni encimi, kakršne imajo ne-halofilni organizmi (Oren, 1999).

Majhna količina biološko dostopne vode je pomemben stresni dejavnik tudi v drugih okoljih (mrzlih in suhih). Pri raziskavah gliv iz arktičnega ledu so ugotovili podobne

prilagoditve, saj tudi te glive kopičijo v celicah določene topljence, ki preprečujejo zamrznitev in s tem dehidracijo ter poškodbe celic; torej pri glivah obstajajo podobni mehanizmi prilagoditve na nizko vodno aktivnost, naj bo to v sušnem, slanem ali pa mrzlem okolju (Gunde-Cimerman in sod., 2003).

2.2.2.2 Metabolizem halofilnih mikroorganizmov

Večina presnovnih procesov mezofilnih organizmov poteka tudi pri halofilnih in halotolerantnih mikroorganizmih. Vendar ima nekaj procesov zgornjo mejo slanosti pri koncentracijah NaCl okoli 100 do 150 g/l. Taki procesi so: metanogeneza z redukcijo ogljikovega dioksida (CO₂) z vodikom (H₂) kot donorjem elektronov, metanogeneza iz acetata, avtotrofna nitrifikacija (oksidacija amonija v nitrit in nitrita v nitrat) in oksidacija acetata s sulfat-reducirajočimi bakterijami (Oren, 2002). Proces, ki poteka tudi pri najvišjih slanostih okolja pa so: fotosinteza, disimilatorni procesi in vsi procesi, ki jih izvajajo organizmi, ki kopičijo KCl v notranjosti celice za uravnavanje ozmotskega pritiska. Koncentracija soli kot omejujoč dejavnik je predvsem povezana z energetskimi zahtevami procesov in porabo energije pri različnih strategijah uravnavanja ozmotskega tlaka v celicah. Proces, pri katerih se proizvaja malo energije, so pri visoki slanosti omejeni na organizme, ki ne uporabljajo energetske zahtevnega sintetiziranja organskih topljencev za uravnavanje ozmotskega pritiska (Oren, 2002). Tak primer je fermentacija, pri kateri je energetski izkoristek zelo majhen, vseeno pa proces poteka pri koncentracijah soli tudi nad 250 g/l. Anaerobni fermentatorski halofilni organizmi redu Halanaerobiales uporabljajo energetsko manj potratno strategijo uravnavanja ozmotskega tlaka s kopičenjem KCl v celici. Ta povezava med energetiko metabolnih procesov in uravnavanja ozmotskega tlaka je razvidna tudi s primerjavo metanogeneze hidrogenotrofnih metanogenih mikroorganizmov, ki proizvajajo organske topljence za ozmotsko regulacijo in zato poteka le do koncentracije soli 120 g/l, in acetogeneze, ki jo opravljajo homoacetogeni organizmi (*Acetohalobium arabaticum*, Halanaerobiales), ki poteka celo pri koncentracijah NaCl 250 g/l (Oren, 2002).

2.2.2.3 Biotehnološka uporabnost halofilnih organizmov

Določene halofilne organizme biotehnološko uporabljajo že stoletja. Primer take uporabe je rdeča obarvanost solinskih bazenov pri izhlapevanju vode. Danes vemo, da jo povzroča barvilo β-karoten v algi *Dunaliella* in nekateri drugi karotenoidi, ki jih proizvajajo nekatere halofilne arheje (Halobacteriaceae). Poleg tega je β-karoten, ki ga proizvaja alga *Dunaliella*, zelo pomemben antioksidant in živilsko barvilo. Čeprav je to barvilo prisotno v mnogih algah in višjih rastlinah, ga pridobivamo iz te alge, ker saj ga lahko vsebuje celo 10 odstotkov svoje suhe mase. Pomemben je tudi visok delež dragocenega 9-cis izomera

barvila v tej algi. Njene celice dodajajo tudi v kozmetične preparate, ki so namenjeni zmanjšanju in preprečevanju gub. Za uporabo v kozmetiki in za nekatere druge namene (na primer stabilizacija encimov, nukleinskih kislin, membran in celic) pa testirajo tudi organske kompatibilne topljence (predvsem aminokislinski derivat ektoin in njegov derivat hidroksiektoin), ki jih kopičijo mnogi halofilni organizmi za ozmotsko regulacijo (Oren, 2002). Pomemben proizvajalec je ekstremno halotolerantna bakterija *Halomonas elongata* (Margesin in Schinner 2001). Halotoleranco encimov halofilnih organizmov (amilaz, proteaz, nukleaz, hidrolaz, izomeraz...) izkoriščajo za procese, ki potekajo v razmerah nizke vodne aktivnosti. Encimi, ki so najbolj odporni na visoko slanost, so citoplazemski encimi organizmov, ki ozmotski pritisk uravnavajo s kopičenjem ionov, in eksoencimi vseh halofilnih organizmov. Mnogi encimi halofilnih organizmov so tudi temperaturno stabilni (Oren, 2002). Pomembni halofilni organizmi, iz katerih pridobivajo kar nekaj različnih encimov so *Pseudomonas* sp., *Haloferax alicantei*, *Halomonas meridiana*, *Halobacterium halobium* in drugi (Margesin in Schinner 2001). Halofilna arheja *Haloferax mediterranei* proizvaja kopolimer β -hidroksibutirata in β -hidroksivalerata, iz katerega izdelujejo termobioplastiko, ki jo odlikuje trdnost in nizko tališče (Oren, 2002). Polimere β -hidroksialkanoatov, iz katerih sedaj pridelujejo temoplastiko, pridobivajo iz nehalofilne bakterije *Ralstonia eutropha*, vendar lahko *H. mediterranei* proizvede ravno toliko te snovi kot *R. eutropha*, poleg tega pa lahko dobro raste na škrobnem gojišču, kar zniža stroške pridobivanja snovi. Polimer, ki ga proizvede *H. mediterranei* je zelo kvaliteten, iz celic pa ga na enostaven način pridobijo z razpadom celic v odsotnosti soli (v hipotoničnem okolju). *H. mediterranei* se hitro razmnožuje, poleg tega pa je zaradi visoke koncentracije soli v gojišču majhna možnost okužbe (Oren, 2002). Ta arheja pa proizvaja tudi druge biotehnološko uporabne snovi: anionski eksopolisaharidi so uporabni za strjevanje gelov in kot gostila ter stabilizatorji. Tako kot sulfatirane kisle heteropolisaharide (tudi produkt te arheje) jih odlikuje visoka viskoznost in odpornost na ekstreme pH in temperature. (Oren, 2002; Margesin in Schinner, 2001). Iz halofilnih arhej (*Halobacterium cutirubrum*) je možno pridobiti tudi kemijsko stabilne in na esterase odporne liposome (Margesin in Schinner, 2001).

Mnoge možnosti uporabe bakteriorodopsina, ki ga proizvaja *Halobacterium salinarum* in nekateri drugi predstavniki družine Halobacteriaceae, še raziskujejo. Njegova uporabnost temelji na odlični termodinamični in fotokemični stabilnosti (Margesin in Schinner, 2001). Nahaja se v celični membrani teh arhej, kjer ima vlogo protonske črpalke, ki jo poganja svetloba. Ta protein ima značilnost, da je stabilen in aktiven tudi v odsotnosti soli, kar je nenavadno za proteine halofilnih mikroorganizmov. Nanašajo ga na steklene plošče in integrirajo v polimere, kjer še dolgo ohrani svoje fotokemične lastnosti. Uporaben je pri pretvarjanju svetlobne energije v kemično, raziskujejo pa tudi njegovo potencialno uporabo v računalništvu, kjer bi imel vlogo optičnega stikala, zaradi njegove transformacije ob osvetljenosti (Oren, 2002). Lastnosti bakteriorodopsina pa raziskujejo

tudi za uporabo v holografiji, prostorskem moduliranju svetlobe in izdelavi umetne mrežnice (Margesin in Schinner, 2001).

Halofilni organizmi so zelo pomembni tudi v živilski industriji, saj mnogi, za proizvodnjo nekaterih živil nujni, procesi (na primer fermentacija) potekajo pri povišani slanosti. Mikroorganizmi, ki sodelujejo v teh procesih, prispevajo k značilnemu okusu in vonju. Zelo pomemben organizem v procesih fermentacije je *Lactobacillus plantarum*. Pri tradicionalnem postopku fermentacije za pridobitev sojine omake (poteka pri 18-odstotni slanosti) sodeluje mlečnokislinska bakterija *Tetragenococcus halophila*, ki s proizvodnjo acetata prispeva k značilnemu okusu omake. Tudi aminokislinske nadomestke in naravna barvila (že omenjeni β -karoten) uspešno pridobivajo iz halofilnih organizmov (Margesin in Schinner, 2001).

Nekatere raziskave kažejo možnost uporabe halofilnih in halotolerantnih organizmov za odstranjevanje snovi iz slanega okolja. Margesin in Schinner (2001) opisujeta možnost uporabe halofilnih in halotolerantnih organizmov za bioremediacijo ob izlivih nafte v slanih okoljih. Halo- in temotolerantna bakterija *Streptomyces alboxialis* lahko razgrajuje surovo nafto in naftne derivate, pri 30-odstotni koncentraciji NaCl. Že v zvezi s svojimi produkti omenjena arheja *Haloferax mediterranei* lahko izkorišča nafto kot glavni vir ogljika in je sposobna rasti pri 10- do 25-odstotni koncentraciji NaCl. Nekateri poskusi s halofilnimi bakterijami so pokazali, da so le-te v obliki biofilma odstranile 99 odstotkov fenola iz odpadne vode s 15-odstotno slanostjo (Woolard in Irvine, 1994). Odpadne vode naftne industrije vsebujejo fenol in so navadno slane, zato so tovrstne raziskave zelo pomembne. Za tako uporabo bi bil lahko primeren tudi *Halomonas* sp., ki lahko razgradi 0,1 g fenola na liter v razmerah 1- do 14-odstotne slanosti (Hinteregger in Streichsbier, 1997). Izolacija dveh mikroorganizmov, sposobnih razgradnje fenola, iz deževnega gozda ob Amazonki, kjer še ni bilo človekovega prispevanja fenolovih spojin, je pokazala, da je lahko kvasovka *Candida tropicalis* prenašala višje koncentracije soli in fenola kot bakterija *Alcaligenes faecalis*. Kvasovka je razgradila 1,5 g fenola na liter pri 15-odstotni slanosti v 148 urah, bakterija pa 1,1 g fenola v 200 urah pri 5,6-odstotni slanosti (Bastos in sod., 2000). Tudi halogenirane organske spojine so obremenilne za okolje zaradi svoje obstojnosti in strupenosti. Odstranjevanje takih ogljikovodikov iz morske vode je možno z bakterijami, ki metabolizirajo metan. Halofilna bakterija *Methylobacterium* sp. asimilira metan in oksidira organske spojine, ki vsebujejo halogene, v prisotnosti soli. Kar nekaj halofilnih mikroorganizmov lahko razgrajuje klorofenole, ki so pogosta sestavina biocidov (Margesin in Schinner, 2001). Onesnaženje vode pa povzročajo tudi organska topila. Opisane so bile aerobne transformacije formaldehida s halofilno bakterijo v slanih razmerah. Iz industrijske odpadne vode je bila izolirana halotolerantna bakterija *Brevibacterium*, ki je sposobna razgrajevati cikloheksanon in cikloheksanol v prisotnosti 10 do 15 odstotkov NaCl (Margesin in Schinner, 2001).

V tej diplomski nalogi smo preučevali možnosti uporabe halofilnih mikroorganizmov za čiščenje slane odpadne vode. Dosedanje raziskave so pokazale, da so halotolerantni mikroorganizmi aktivnega blata aktivni pri 1 do 2-odstotni koncentraciji NaCl, halofilni mikroorganizmi pa uspešno razgrajujejo organske snovi pri več kot 4-odstotni koncentraciji NaCl (Margesin in Schinner, 2001). Znani so tudi poskusi uporabe halofilnih fotosintetskih bakterij za proizvodnjo alternativne energije v obliki vodika, za kar je potrebna samo svetloba in poceni organske snovi, na primer škrob. Vodik lahko proizvajajo v prisotnosti soli, zato je lahko primerno gojišče tudi morska voda z biomaso alg, ki so lahko hrana za fotosintetske bakterije. (Margesin in Schinner, 2001). Možnosti uporabe halofilnih mikroorganizmov so tudi na področju pridelave poljščin, kjer je v prsti povišana koncentracija soli.

Halotolerantne cianobakterije, ki lahko vežejo dušik iz zraka, so preizkušali za izboljšanje zmerno slane prsti. Poskusi s prenosom določenih genov iz halofilnih organizmov v poljščine, ki rastejo na površinah s povišano koncentracijo soli v prsti, so dali začetne obetavne rezultate (Margesin in Schinner, 2001).

Ker še ne poznamo vseh halofilnih organizmov, ki se pojavljajo v naravnih okoljih, lahko pričakujemo, da bodo s prihodnjimi odkritji organizmov in razvojem molekularnih tehnik, raziskane tudi nove možnosti uporabe teh organizmov in njihovih produktov.

2.3 Biološke čistilne naprave

Sodobna naselja imajo v večini vodovod in kanalizacijo, ki omogočata kvaliteto bivanja ljudi. Zaradi odpadnih voda se stalno pojavlja potreba po čisti pitni vodi. Čiščenje odpadne vode, poteka s pomočjo mikroorganizmov, ki so sposobni razgrajevati mnogo organskih snovi, kar omogoča tudi kroženje elementov, na primer dušika, fosforja in ogljika. Mikroorganizme ljudje že dolgo izkoriščamo v bioloških čistilnih napravah, ki predstavljajo enega najpomembnejših biotehnoloških procesov v uporabi, saj preprečujejo (zmanjšujejo) onesnaženje okolja in razširjanje nekaterih bolezni (Daims in sod., 2006). Biološke čistilne naprave vključujejo biokemijske procese razgradnje in odstranjevanja snovi, ki bi v okolju predstavljale motnje za naravno ravnovesje. Za čiščenje biološko razgradljivih snovi so najprimernejše biološke čistilne naprave, ki posnemajo naravne procese kroženja snovi in pretoka energije (Urbanič in Toman, 2003). Tako čiščenje temelji na mikroorganizmih aktivnega blata, ki uporabljajo organske snovi kot hrano za svojo rast in jih hkrati odstranjujejo iz vode. Odstranjevanje snovi v bioloških čistilnih napravah poteka navadno v treh stopnjah: primarni, sekundarni in terciarni.

2.3.1 Procesi v bioloških čistilnih napravah

V primarni stopnji čiščenja potekajo mehanski procesi, s katerimi se odstranijo večji kosi, ki se usedajo in ustavljajo na rešetkah. V usedalniku, kamor teče voda brez največjih delcev, se usedajo preostali delci, ki so večji od 0,1 mm. Tu se lahko razgradi že približno tretjina organskih snovi (Urbanič in Toman, 2003).

V sekundarni stopnji čiščenja imajo največjo vlogo mikroorganizmi aktivnega blata. Ti lahko procese razgradnje snovi opravljajo v prisotnosti kisika (aerobne razmere) ali pa v njegovi odsotnosti (anaerobne razmere) (Urbanič in Toman, 2003). S procesi v drugi stopnji čiščenja se zmanjša biokemijska potreba po kisiku (BPK), količina suspendiranih snovi in strupenost (predvsem pri industrijskih odplakah), voda na iztoku pa je s hranili revnejša ter za okolje veliko manj obremenilna (Gilbride in sod., 2006).

Organizmi, ki opravljajo razgradnjo v **prisotnosti kisika**, organske snovi najprej biokemijsko pretvorijo v nizkomolekularne organske snovi, nato pa poteče oksidacija le-teh in s tem pretvorba v anorganske snovi (mineralizacija). Te pa se lahko odstranjujejo v terciarni stopnji čiščenja. Organizmi, ki sodelujejo v sekundarni stopnji čiščenja, so lahko razpršeni (aktivno blato) ali pa pritrjeni (biofilm).

Biološke čistilne naprave, v katerih prevladuje aktivno blato, imajo v sekundarni stopnji čiščenja dve osnovni enoti: prezračevalnik in sekundarni usedalnik. V prezračevalniku razpršeni mikroorganizmi biokemijsko razgrajujejo organske snovi, v sekundarnem usedalniku pa se aktivno blato useda, očiščena voda pa ostaja na vrhu. Mikroorganizmi aktivnega blata oblikujejo kosme, kar je zelo pomembno pri usedanju biomase, pa tudi v samem procesu čiščenja. V kosme se združujejo aerobni in fakultativno anaerobni mikroorganizmi (predvsem bakterije), poseljujejo pa jih organizmi spremljajoče združbe. Med kosmi je intersticijska tekočina, v kateri so predvsem bakterije, bičkarji, migetalkarji in kotačniki (Urbanič in Toman, 2003).

Biološke čistilne naprave, kjer je biomasa pritrjena, so lahko v obliki precejalnikov, biofiltrov in biodiskov. Biofilm je sestavljen iz mikroorganizmov, ki se lahko pritrdijo na podlago, ko jih prinese odpadna voda. Po pritrditvi se razmnožujejo in debelina biofilma se povečuje. Mikroorganizmi razgrajujejo organske snovi iz vode, ki teče preko biofilma. Med seboj se organizmi (predvsem nitaste bakterije in glive) v biofilmu povezujejo, deli te prirasle biomase pa se trgajo in se usedajo v sekundarnem usedalniku. Tudi biofilm naseljujejo organizmi spremljajoče združbe (maloščetinci, gliste, kotačniki, migetalkarji), ki pomagajo pri rahljanju obrasti (Urbanič in Toman, 2003). Večina mikroorganizmov v naravi (do 99 odstotkov) je pritrjenih na površine, v obliki kooperativnih konzorcijev. Tak način življenja ima številne prednosti za posamezne organizme, na primer gensko izmenjavo, metabolično kooperacijo in zaščito pred zunanjimi dejavniki (UV, pH...) ter predatorji. Struktura biofilma je dinamična in se prilagaja okoljskim spremembam (Stopar, 2005).

Odstranjevanje dušika iz odpadne vode je najpomembnejši proces čiščenja, saj dušik v vodi največ prispeva k eutrofikaciji, v obliki amoniaka in nitrita pa je tudi nevaren za vodne organizme (Daims in sod., 2006). V odpadni vodi je dušik večinoma v obliki amonija in uree (sečnine) (Wagner in Loy, 2002).

V odstranjevanje dušika iz vode so vključeni trije glavni procesi: nitrifikacija, denitrifikacija in anaerobna oksidacija amonija (anamoks). Mikrobna aerobna oksidacija amonija (nitrifikacija) poteka v dveh korakih. Prvi je nitritacija z amonij-oksidirajočimi bakterijami, kjer nastane nitrit (NO_2^-). Drugi korak je nitratacija, s katero nastane nitrat (NO_3^-) in jo lahko opravljajo nitrit-oksidirajoče bakterije. V biofilmih lahko živijo bakterije (na primer *Nitrospira*), ki imajo različne preference glede koncentracije nitrita, zato zasedajo različne mikroniše vzdolž gradienta koncentracije nitrita (Daims in sod., 2006). Učinkovitost nitrifikacije je zelo odvisna od pH, temperature in prisotnosti kisika.

Nerespiratorna in respiratorna denitrifikacija sta procesa disimilativne redukcije nitrata. Pri nerespiratorni denitrifikaciji, ki jo lahko opravljajo nekatere bakterije, alge, glive, živali in višje rastline (le-te v povezavi z mikroorganizmi), se pretvori nitrat v dušikov oksid (N_2O). Pomembnejši proces redukcije nitrata je respiratorna denitrifikacija, pri kateri nastajajo plinski produkti. Tu se sprosti tudi energija, ki jo mikroorganizmi lahko porabljajo za rast. Pomembni dejavniki za učinkovitost denitrifikacije pa so dostopnost nitrata in ogljika ter zračenje (aeracija) (Stopar, 2005).

Pomemben proces je tudi odstranjevanje fosforja. Za čistilne naprave, ki imajo poudarek na odstranjevanju fosforja, so značilni cikli anaerobnih in aerobnih razmer. S tem se spodbuja rast organizmov, ki shranjujejo polifosfate v celicah ob prisotnosti kisika, s tem pa omogočijo učinkovito odstranjevanje fosforja preko odstranjevanja njihove biomase (Wagner in Loy, 2002).

Od **anaerobnih** procesov v biološki čistilni napravi je najpomembnejša metanogeneza, ki predstavlja del kroženja ogljika. Končni produkt je metan, ki lahko nastane iz vodika in ogljikovega dioksida (avtotrofni organizmi), ali pa iz produktov delne oksidacije ogljika pri fermentacijah (heterotrofni organizmi). Poteka lahko ob prostorski povezavi različnih mikroorganizmov, na primer v kosmih (Stopar, 2005). Tudi tu v procesu razgradnje nastajajo nizkomolekularne organske snovi, ki pa se v naslednjih stopnjah pretvorijo v pline (bioplin), od katerih sta najpomembnejša metan (CH_4) in vodik (H_2). Metan lahko izkoriščamo kot vir energije. Anaerobno čiščenje ima tudi druge prednosti, kot je velika zmogljivost in majhna količina biomase. Pomanjkljivost pa je, da z anaerobnim čiščenjem lahko le delno očistimo odpadno vodo, anaerobni organizmi so tudi precej občutljivi na nekatere strupene snovi. Zaradi počasne rasti biomase je potrebno dolgo časa vzpostavljati stanje optimalnega delovanja čistilne naprave (Urbanič in Toman, 2003).

Anaerobne razmere lahko nastanejo tudi v biofilmu ali pa v sredini kosmov, ki jih oblikujejo skupine mikroorganizmov in organizmi spremljajoče združbe. Zelo pomemben

proces, ki se odvija v anaerobnih razmerah je anaerobna oksidacija amonija ali anamoks. Kemolitotavtotrofne anamoks bakterije pretvarjajo viške amonija v dušik, ki se nato izloči v atmosfero. Ta reakcija lahko poteka pri manj kot 5-milimolarni koncentraciji kisika (Stopar, 2005). Anamoks reakcija je še posebej primerna za odpadne vode z visoko koncentracijo amonija in nizko koncentracijo ogljika (Daims in sod., 2006).

Terciarna stopnja čiščenja uporabljajo za odstranitev snovi, ki jih mikroorganizmi v sekundarni stopnji niso odstranili, torej v primerih previsokih vrednosti BPK₅, amonija, nitratov in fosfatov na iztoku iz čistilne naprave. Terciarno stopnjo lahko predstavljajo različni filtri, ionski izmenjevalci, posebej prirejeni načini čiščenja z aktivnim blatom in tudi rastlinske čistilne naprave, ki pa lahko predstavljajo vse stopnje čiščenja in so tako samostojni čistilni sistemi (Urbanič in Toman, 2003).

2.3.1.1 Rastlinske čistilne naprave

Vcepek, ki smo ga pripravljali v tej diplomski nalogi, je namenjen tudi za čiščenje slane odpadne vode v rastlinskih čistilnih napravah (RČN), v katerih čiščenja ne opravljajo le višje rastline, temveč tudi mikroorganizmi. Rastline predstavljajo sklenitev kroženja snovi, ki je zato v takih čistilnih napravah podobno naravnemu. Mikroorganizmi razgrajujejo organske snovi in jih pretvarjajo v anorganske, ki jih porabljajo rastline. Te pa vežejo iz vode tudi težke kovine in nekatere druge snovi, ki se v klasičnih čistilnih napravah ne odstranjujejo. RČN so grajene po zgledu močvirij, katerih samočistilne sposobnosti so zelo visoke. Ker so navadno grajene tako, da voda s pomočjo gravitacije teče iz enega v drug bazen, za njihovo delovanje ni potrebno dovajanje električne energije. Bazeni so navadno napolnjeni s substratom, v katerega so posajene rastline, ki imajo koreninski sistem poplavljen z vodo, iz katere privzemajo snovi. RČN je sestavljena iz zadrževalnika, kjer se usedajo grobi delci, filtrirne grede, ki je prva greda RČN in je namenjena odstranitvi preostalih suspendiranih delcev, iz nje pa voda teče v čistilne grede, kjer se odstranijo še ostale snovi. Taka voda je primerna za izpust v okolje, saj je očiščena po predpisanih normativih (Vovk Korže in Vrhovšek, 2006).

2.3.2 Organizmi v bioloških čistilnih napravah

Čiščenje odpadne vode je eden od najpomembnejših biotehnoloških procesov, ker pa so vanj vključeni različni mikroorganizmi, so lahko biološke čistilne naprave tudi vir informacij o mikroorganizmih in njihovi vrstni pestrosti, procesih, ki jih opravljajo, nišah, ki jih zasedajo ter podobnih informacij, ki nas zanimajo, ko preučujemo mikrobne združbe. Pripomorejo lahko k boljšemu razumevanju kompleksnosti mikrobnega življenja (Daims in sod., 2006). Organizme aktivnega blata v bioloških čistilnih napravah lahko razdelimo na

razgrajevalce organskih snovi (bakterije, glive) in organizme spremljajoče združbe (bičkarji, korenonožci, migetalkarji, kotačniki, maloščetinci in gliste). Bakterije so lahko razpršene (posamezne celice), lahko tvorijo kosme (najbolj zaželena oblika združevanja bakterij), ali pa so nitaste (niso zaželeni, ker povzročajo napihovanje blata) (Urbanič in Toman, 2003). Organizmi spremljajoče združbe v veliki meri prispevajo k čiščenju odpadne vode. Prehranjujejo se z razpršenimi bakterijami in tako uravnavajo njihovo število. S tem veliko pripomorejo h kakovosti vode na iztoku iz čistilne naprave, saj posamezne razpršene bakterijske celice ne tonejo in zato lahko iztekajo iz sistema. Najpomembnejši organizmi spremljajoče združbe so pripadniki migetalkarjev, ki odstranjujejo tudi organske delce. Ti organizmi so lahko prosto plavajoči (*Paramecium*), posamezni ali kolonijski pritrjeni (*Vorticella*), prosto gibljivi plenilci (*Aspidisca*) in drugi. Od mnogoceličarjev je največ kotačnikov (Urbanič in Toman, 2003). V bioloških čistilnih napravah se opravljajo tudi merjenja različnih parametrov (vsebnost kisika, pH, temperatura, vsebnost hranil), kar nam lahko da dodatne podatke o mikrobnih združbah in vplivu teh parametrov nanje. Poleg tega pa so čistilne naprave precej stabilno okolje s procesi, ki se pojavljajo tudi v naravi (Daims in sod., 2006).

Proces nitrifikacije lahko opravljajo amonij-oksidirajoči rodovi (nitritatorji), na primer *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosolobus* in *Nitrosovibrio* ter nitrit-oksidirajoči rodovi bakterij (nitratorji), na primer *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus* in *Nitrospina*, ki so večinoma avtotrofni. Najpomembnejši encim nitratorjev je nitrit oksidaza. Pri nitritatorjih pa je glavni encim amonij monooksigenaza (Stopar, 2005). To so počasi rastoče bakterije, zato lahko traja zelo dolgo, da se proces nitrifikacije ponovno vzpostavi, če jih odnese iz čistilne naprave ali če odmrejo. Nitratorji iz rodu *Nitrospira* so zelo pomembni tudi v vodovodnih sistemih in v prsti (Wagner in Loy, 2002). Proces respiratorne denitrifikacije opravljajo heterotrofne bakterije iz skupin *Pseudomonade*, *Bacillus*, *Rhizobium* (Stopar, 2005). Anaerobna respiracija z nitratom ali nitritom pa je zelo razširjena med različnimi bakterijami in arhejami (Wagner in Loy, 2002).

Za organizme, odgovorne za odstranjevanje fosforja, je na osnovi gojitvenih metod veljalo, da je najpomembnejši rod *Acinetobacter*. Kasneje se je izkazalo, da so tu vodilni organizmi verjetno bakterija *Candidatus Accumulibacter phosphatis* in nekateri drugi sorodniki rodu *Rhodocyclus* (Wagner in Loy, 2002; Daims in sod., 2006).

Metanogene arheje so razširjene po vsem svetu, v različnih anaerobnih habitatih, kjer poteka razgradnja organskih snovi, na primer v sladkovodnih in morskih sedimentih, prebavilih živali in anaerobnih delih čistilnih naprav. Njihovo razširjenost si lahko razlagamo s substrati, ki jih potrebujejo za produkcijo metana, saj so to končni produkti mnogih fermentacij in anaerobnih oksidacij, ki jih opravljajo bakterije in evkarionti. Pomembne družine metanogenih arhej so Methanobacteriaceae in Methanothermaceae iz reda Methanobacteriales, Methanococcaceae iz reda Methanococcales in družini

Methanomicrobiaceae in Methanosarcinaceae iz reda Methanomicrobiales (Jones in sod., 1987).

Anamoks opravljajo kemolitoavtotrofne bakterije iz debla Planctomycetes, ki se v bioloških čistilnih napravah lahko pojavljajo v velikem številu. Rast teh bakterij pa je, tako kot pri ostalih striktnih anaerobih, zelo počasna, zato njihova uporaba ni razširjena (Daims in sod., 2006), čeprav opravljajo zelo zaželeno odstranjevanje dušikovih spojin s pretvorbo v neškodljiv plinski dušik.

V aktivnem blatu bioloških čistilnih naprav so tudi predstavniki gliv. Že Bridge Cooke (1970) je v svoji raziskavi potrdil prisotnost 93 različnih vrst gliv v združbi, ki opravlja sekundarno in terciarno čiščenje. Rodovi z največ prisotnimi vrstami so bili *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Torulopsis* in *Trichosporon*. Pred to objavo so mislili, da glive v čistilnih napravah povzročajo le napihovanje blata. V sistem čistilne naprave lahko glive pridejo iz zraka ali pa z odpadno vodo (Bridge Cooke, 1970).

Nekateri organizmi v bioloških čistilnih napravah pa pripomorejo tudi k slabšemu delovanju le-teh, saj lahko povzročajo nastanek pene na površini bazenov. Pena nastaja zaradi hidrofobnih niti nitastih bakterij, ki zmanjšajo kompaktnost kosmov. Taki kosmi se prilepijo na zračne mehurčke in plavajo na površini. Filamenti, ki povzročajo penjenje, pripadajo zelo različnim, v veliki meri še neznanim bakterijam. Med znanimi je *Microthrix parvicella*, ki lahko izkorišča veliko različnih organskih substratov (Daims in sod., 2006). Ugotovili so, da lahko ta po Gramu pozitiven organizem privzema in shranjuje dolgoverizne maščobne kisline v anaerobnih razmerah, nato pa jih v prisotnosti kisika presnavlja, kar je velika prednost v čistilnih napravah z anaerobnimi in aerobnimi razmerami (Wagner in Loy, 2002). Težave, ki jih povzročajo ti organizmi, so navadno povezane z njihovo preveliko številčnostjo, saj je sicer prisotnost nitastih struktur pomembna za oblikovanje kosmov. V primeru velikega porasta njihovega števila, pride tudi do kompeticije z ostalimi mikroorganizmi, ki opravljajo čiščenje (Wagner in Loy, 2002).

2.3.2.1 Preučevanje mikrobnih združb v bioloških čistilnih napravah

Pred razvojem molekularnih tehnik so mikrobne združbe preučevali s svetlobno mikroskopijo in gojitvenimi tehnikami. Tako so našli domnevno najpomembnejše organizme, odgovorne za procese v bioloških čistilnih napravah, ni pa bilo mogoče dobiti natančnejših podatkov o sestavi in spreminjanju mikrobnih združb. Razvoj molekularnih tehnik v zadnjih desetletjih pa je pokazal, da so mnogi, prej domnevno najpomembnejši organizmi za čiščenje odpadne vode, v resnici manj pomembni. Za pomembnejše so se izkazali trenutno še negotovljivi organizmi. Molekularne tehnike so pomembne tudi zaradi lastnosti bakterijskih celic, da zrastejo v različnih oblikah, kar bi lahko z mikroskopskimi metodami prepoznali kot različne vrste. Primer so nitaste bakterije, ki se pojavljajo tudi v

obliki brez filamentov. Vpogled v njihovo ekofiziologijo je omogočila kombinacija molekularnih metod za preučevanje sestave mikrobnih združb in tehnik, ki omogočajo preučevanje funkcij mikroorganizmov (Wagner in Loy, 2002).

Veliko podatkov o sestavi mikrobnih združb je bilo pridobljenih s pomočjo gena za 16S rRNA. V kombinaciji z drugimi molekularnimi tehnikami (na primer FISH-fluorescenčna *in situ* hibridizacija) in digitalizacijo, ki omogoča računalniško analizo slik, pridobljenih z modernimi mikroskopskimi metodami, je mogoče dobiti natančnejše podatke o sestavi in spremembah v mikrobnih združbah. Zelo uporabne molekularne tehnike za preučevanje spreminjanja mikrobnih združb so tudi DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) in TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Slednjo smo uporabljali tudi za preučevanje strukture mikrobnih združb v tem diplomskem delu. Metoda omogoča vpogled v strukturo bakterijskih združb, pomemben je gen za 16S rRNA, in glivnih združb, na podlagi gena za 18S rRNA (Wagner in Loy, 2002).

Za preučevanje amonij-oksidirajočih bakterij, ki opravljajo proces nitritacije, je pomemben gen (*amoA*), ki kodira podenoto amonij monooksigenaze, prisotne pri vseh nitritatorjih. Pomembna je tudi kombinacija metod avtoradiografije in fluorescenčne *in situ* hibridizacije (FISH), ki omogoča detekcijo fiziološko aktivnih nitritatorjev. V tem postopku je v substratu označen ogljik (^{14}C). S samo metodo FISH zaznamo tudi fiziološko neaktivne nitritatorje. Tudi kombinacija metod verižne reakcije s polimerazo (PCR) in FISH je uporabna za preučevanje kompleksnih vzorcev aktivnega blata. Za določanje in preučevanje aktivnosti organizmov, ki opravljajo denitrifikacijo, so pomembni geni za nitrit reduktazo (*nirS* in *nirK*) in avtoradiografija, s katero lahko dobimo podatke o številu bakterij, ki privzemajo acetat ob procesu denitrifikacije (Wagner in Loy, 2002).

Preučevanje mikrobnih združb v sistemih za čiščenje pitne in odpadne vode je bilo dolgo deljeno na dve področji. Ekologe je zanimala pestrost organizmov in njihova funkcija v sistemu (na primer penjenje, nitrifikacija, odstranjevanje fosforja), raziskovalce s področja zdravstva pa identifikacija in število patogenih organizmov. Z novimi tehnologijami (na primer mikromreža ali mikroraster) lahko istočasno določimo prisotnost in funkcijo genov več tisoč organizmov in dobimo podatke o raznolikosti združbe ter o prisotnosti patogenih organizmov (Gilbride in sod., 2006).

Razvoj molekularnih metod za preučevanje mikrobnih združb v čistilnih napravah je privedel do veliko boljšega razumevanja dogajanj v teh sistemih. Odkriti so bili organizmi, katerih pomen za čiščenje odpadne vode je bil, samo z rezultati gojitvenih tehnik, skrit. Z metodami za analizo funkcij organizmov *in situ* so se odprle nove možnosti za preučevanje ekofiziologije teh biotehnološko pomembnih mikroorganizmov. Te tehnike bodo vedno bolj pripomogle k razumevanju povezave med sestavo mikrobnih združb, njeno funkcijo in procesi, ki jih opravlja. S takimi raziskavami lahko dobimo tudi podatke o tem, kako oblika čistilne naprave vpliva na sestavo združbe za čiščenje najpomembnejših

mikroorganizmov (Wagner in Loy, 2002). Pomembna pa je tudi natančnejša detekcija patogenih mikroorganizmov, ki se lahko razmnožujejo v teh sistemih, in preučevanje interakcij med mikrobi in mikrobnimi združbami (Gilbride in sod., 2006).

2.4 Prisotnost soli v bioloških čistilnih napravah in mikroorganizmi

Biološko čiščenje odpadne vode s povišano slanostjo je navadno povezano s slabšimi rezultati zmanjševanja biokemijske potrebe po kisiku, ker ima sol zaviralne učinke na procese, ki jih opravljajo mikroorganizmi aktivnega blata. Več kot 1-odstotna koncentracija soli v odpadni vodi lahko povzroči razpad celic ali vsaj zmanjšano aktivnost (Kargi in Dinçer, 1998). Najbolj uničujoča za organizme pa so hitra nihanja slanosti. Raziskave so pokazale, da nenadna 3-odstotna slanost zmanjša učinkovitost čiščenja za 30 odstotkov. V primeru, ko združba, ki je prilagojena na 3-odstotno slanost pride v sladko vodo, pa se učinkovitost čiščenja zmanjša celo za 75 odstotkov. Sol zmanjša sposobnost povezovanja mikroorganizmov v kosme, vpliva pa tudi zaviralno na proces nitrifikacije. Glavne ovire, ki se pojavljajo pri čiščenju slane odpadne vode, so povezane z omejeno sposobnostjo prilagajanja mikrobnih združb na slane razmere, občutljivostjo organizmov na (hitre) spremembe ozmotskih razmer, manjšo učinkovitostjo razgradnje v prisotnosti soli in manj številčnimi populacijami praživali in nitastih organizmov, kar zmanjša usedanje. Ob preizkušanju različnih združb, ki bi bile primerne za čiščenje vode, ki vsebuje sol, sta Kargi in Dinçer (1998) ugotovila, da se učinkovitost odstranjevanja organskih snovi (merjeno kot zmanjševanje kemijske potrebe po kisiku (KPK)) poviša, če je združba aktivnega blata obogatena s halotolerantnimi organizmi *Halobacter halobium*. Še posebej opazne razlike v učinkovitosti so pri odpadni vodi, ki vsebuje nad 3 odstotke NaCl. Dinçer in Kargi (2001) sta raziskovala učinke soli v odpadni vodi na proces nitrifikacije, ki ga opravljajo bakterije iz rodov *Nitrosomonas* in *Nitrobacter*. Določila sta konstanto nitrifikacije in primerjala vplive različnih dejavnikov (starost združbe aktivnega blata, zadrževalni čas odpadne vode v modelu...) na nitrifikacijo v modelih čistilnih naprav z umetno odpadno vodo. To sta upoštevala pri izračunih stopnje nitrifikacije v odpadni vodi s prisotnostjo različnih koncentracij soli. Izračunala sta konstanto zaviralnih učinkov soli na nitrifikacijo. Za skoraj popolno nitrifikacijo odpadne vode brez soli, je bilo potrebno gojiti enako začetno količino organizmov aktivnega blata (*Nitrosomonas* in *Nitrobacter*) 12 dni, v primeru 3-odstotne koncentracije NaCl pa 25 dni. Učinkovitost nitrifikacije je bila pri 3-odstotni koncentraciji NaCl 96-odstotna, pri 5-odstotni koncentraciji NaCl pa pade na 80 odstotkov.

Zaviralne učinke soli sta preučevala tudi Uygur in Kargi (2004) in ugotovila, da se ob povišanju koncentracije NaCl z 0 na 6 odstotkov učinkovitost odstranjevanja organskih snovi v čistilni napravi zmanjša s 96 na 32 odstotkov (vrednosti KPK so se povišale s 25 mg/l na 659 mg/l). Odstranjevanje organskih snovi je nad 90-odstotno, če je koncentracija NaCl manj kot 0,5-odstotna. Učinkovitost odstranjevanja dušikovih snovi (NH₄-N) se je ob

takem povišanju koncentracije NaCl zmanjšala s 96 na 39 odstotkov. Pri manj kot 1-odstotni slanosti je bilo odstranjevanje dušika več kot 80-odstotno. Učinkovitost odstranjevanja fosforjevih snovi ($\text{PO}_4\text{-P}$) se je, ob povišanju koncentracije NaCl na 6 odstotkov, zmanjšala s 84 na 22 odstotkov (koncentracija $\text{PO}_4\text{-P}$ v iztoku se je povišala z 1,3 na 8,3 mg/l). Učinki soli so se tu bolj močno izrazili kot pri odstranjevanju organskih in dušikovih snovi, saj je znaten upad odstranjevanja fosforjevih snovi viden že pri 0,5-odstotni slanosti. To bi lahko bila posledica večje občutljivosti organizmov, ki privzemajo odvečne fosfate, na ozmotske spremembe. Zanimivo je, da je odstranjevanje fosforja ostalo skoraj enako učinkovito pri več kot 4-odstotni koncentraciji NaCl (Uygur in Kargi, 2004).

Ob prisotnosti soli v odpadni vodi, ki je pogosto povezana tudi s prisotnostjo drugih škodljivih snovi, je ukrepov za zmanjšanje prizadetosti procesa čiščenja lahko več. Če vcepimo organizme, odporne na snovi, ki so prisotne v vodi poleg soli, je potrebno vodo redčiti, da dosežemo manjšo koncentracijo soli (na primer manj kot 2 odstotka). Ta ukrep je pogosto neizvedljiv zaradi velikih potreb po sladki vodi in zaradi dodatnih prilagoditev v delovanju čistilne naprave. Drugi možen ukrep je prilagoditev združbe mikroorganizmov na razmere v taki odpadni vodi (Hinteregger in Streichsbier, 1997).

Halotolerantne in halofilne mikroorganizme, ki lahko živijo pri visoki koncentraciji soli, najdemo v naravnih habitatih z visoko vsebnostjo soli. Nekateri od teh organizmov pa živijo v slanih okoljih, kjer so prisotne tudi snovi, ki so za večino organizmov škodljive (na primer fenol), in te snovi razgrajujejo ter izkoriščajo kot hrano za svojo rast. Hinteregger in Streichsbier (1997) sta raziskovala sposobnost razgradnje fenola v umetni odpadni vodi pri zmerno halofilni bakteriji iz rodu *Halomonas*. Ugotovila sta, da je optimalna slanost med 3 in 5-odstotno koncentracijo NaCl, ko ta bakterija razgradi fenol v najkrajšem času (13 ur za 0,1 g fenola na liter gojišča). Ob povišanju koncentracije soli se je podaljšal čas razgradnje, vendar je bila le-ta popolna. Pri koncentracijah NaCl pod 3 odstotki je bila rast populacije in razgradnja fenola manjša, v odsotnosti NaCl je ni bilo. Pri razgradnji fenola ob 3-odstotni koncentraciji soli *Halomonas* proizvaja še potencialno uporabno kislino. To bakterijo bi lahko uporabljali za čiščenje in razstrupljanje slane, s fenolom onesnažene odpadne vode (Hinteregger in Streichsbier, 1997). Iz prsti v deževnem gozdu ob Amazonki (okolje, ki ni obremenjeno s fenolom, ki bi ga tja zanesla človeška dejavnost) so izolirali kvasovko *Candida tropicalis* in bakterijo *Alcaligenes faecalis*, ki lahko živita v razmerah visoke slanosti in prisotnosti fenola in ga tudi razgrajujeta. Za primerjavo učinkovitosti razgradnje fenola so v raziskavi uporabili bakterijo *Rhodococcus erythropolis*, za katero je tudi znano, da razgrajuje fenol. Kvasovka je primerljivo koncentracijo fenola razgradila hitreje od bakterije. Ugotovili so tudi, da ima višji prag maksimalne koncentracije fenola, ki ga lahko razgradi, in višji prag slanosti, učinkovita pa je lahko tudi v večjem razponu pH vrednosti (3 do 9), kot bakterija. Obe sta razgrajevali fenol bolje od kontrolne bakterije. Ta raziskava je pokazala, da lahko tudi v biotsko pestrih neobremenjenih okoljih najdemo organizme, ki so lahko primerni za čiščenje različnih snovi iz onesnaženega okolja. Okolja, ki imajo veliko raznovrstnost organizmov, so v nekaterih primerih torej najbolj primerna

za iskanje organizmov, ki bi jih lahko uporabili za odstranjevanje polutantov, saj je precej možnosti, da zaradi genetske pestrosti dobimo želen organizem. V onesnaženih okoljih namreč lahko najdemo organizme, ki zaradi adaptacije postanejo odporni na polutant, a tega ne odstranjujejo, ker nimajo potrebnih encimov, temveč le tolerirajo njegovo prisotnost. Učinkovita metoda za pridobitev organizmov, ki razgrajujejo snov, ki jo želimo odstraniti, hkrati pa tolerirajo visoko slanost, je izolacija organizmov, ki najbolj učinkovito odstranjujejo polutant, potem pa s koadaptacijo določiti med njimi tiste, ki so učinkoviti v prisotnosti soli in najbolj primerni za bioremediacijo (Bastos in sod., 2000).

Odkrite so bile tudi bakterije iz slanih okolij, ki so sposobne razgradnje malationa, organofosfatnega insekticida, ki so ga uporabljali za zatiranje populacij komarjev. Ugotovili so, da se razgradnja malationa s takimi organizmi povečuje z višanjem slanosti. Tudi tu se pojavijo kislinski stranski produkti razgradnje. Na boljšo razgradnjo pa je vplival tudi dodatek vira energije v obliki peptona (Bourquin, 1977).

V živilsko predelovalni industriji je pogosto v odpadni vodi prisotna sol. Japonska tradicionalna kulinarčna posebnost so slane slive (marelice) *umeboshi*. Pri njihovi proizvodnji nastane veliko (40.000 ton letno) slane odpadne vode, z okoli 15-odstotno vsebnostjo NaCl, pH vrednost te vode pa je okoli 2.5. Organizmi aktivnega blata, ki so navadno prisotni v bioloških čistilnih napravah, v takih razmerah ne morejo opravljati čiščenja. Možna rešitev je redčenje take vode, za kar pa je potrebno veliko sladke vode. Primernejši je učinkovit sistem z organizmi, ki lahko opravljajo čiščenje v takih razmerah. V raziskavi so ugotovili, da je potrebno pri hkratni visoki slanosti in nizkem pH kislost omiliti, ker sicer ni mikrobne rasti. Našli so dve najpomembnejši bakterijski vrsti, ki lahko živita v takih razmerah, *Staphylococcus* sp. in *Bacillus cereus*, in ju vcepili v poskusno čistilno napravo. Čeprav je bila na odprtem, se vanjo niso naselili drugi mikroorganizmi, zmanjšanje vrednosti KPK pa je bilo veliko, kljub visoki slanosti (Kubo in sod., 2001).

Lefebvre in sodelavci (2006) so preučevali mikrobne združbe v iztoku iz strojarne usnja in v treh čistilnih napravah, ki čistijo odpadno vodo iz strojarn. Dokazali so veliko raznolikost združb v teh, zelo slanih odpadnih vodah. Odstranjevanje škodljivih snovi iz zelo slanih voda predstavlja okoli 5 odstotkov vseh svetovnih potreb po čiščenju odpadnih voda. Kljub temu je še vedno malo informacij o mikrobem življenju v čistilnih napravah, ki čistijo odpadno vodo z visoko vsebnostjo soli. Znano pa je, da je pestrost halotolerantne mikrobne združbe, ki opravlja čiščenje slane odpadne vode, primerljiva s pestrostjo mikrobne združbe, ki čisti odpadno vodo brez soli. Primerljiva je tudi učinkovitost odstranjevanja organskih snovi. Sicer pa so ugotovili, da so glavnino združbe aktivnega blata v slani odpadni vodi iz strojarne predstavljale bakterije s precej drugačnimi predstavniki, kot so znani za druga slana okolja. Izkazalo se je, da je dejavnik, ki najbolj vpliva na sestavo združbe, prav slanost. Halofilni organizmi postanejo bolj pogosti v združbi že pri precej nizki koncentraciji soli (Lefebvre in sod., 2006).

Če je čistilna naprava, ki čisti slano odpadno vodo, obremenjena tudi z visokimi koncentracijami amonijaka, se pojavijo kombinirani zaviralni učinki. V tem primeru mora biti dnevni vnos amonijaka do 4 g na liter, molarna koncentracija soli pa manj kot 3-odstotna (velja za različne soli), da lahko nitrifikacija še poteka. Raziskava je pokazala, da ob višanju koncentracije soli upada stopnja nitrifikacije. Odpadna voda z visoko vsebnostjo dušikovih snovi pa pogosto vsebuje tudi druge ione, kot je kloridni (ribogojnice) ali sulfatni (usnjarstvo) ion. Nitrifikacija je najbolj občutljiv proces na povišano slanost. Ob veliki koncentraciji dušika v vodi pa nitrifikacijo ovira tudi pomanjkanje kisika. Zato pri manj kot 2 mg/l raztopljenega kisika ostaja v vodi veliko nitrita. Slanost pa vpliva na aktivnost biomase in lahko izniči morebitno višjo učinkovitost nitrifikacije, ki bi bila posledica povišanja koncentracije biomase. Na sol prilagojena biomasa je manj občutljiva na zaviralne učinke soli (Campos in sod., 2002).

2.4.1 Prilagoditveni odzivi mikrobnih združb

Za mikroorganizme je značilno, da se posamezne generacije hitro menjajo, posamezen mikroorganizem pa ima kratko življenjsko dobo. Veliko število generacij v kratkem času pomeni, da je zaradi mutacij potrebnega relativno malo časa, da se mikroorganizmi genetsko prilagodijo na nove razmere v okolju. Ostali organizmi, ki imajo daljšo življenjsko dobo, se lahko v krajših časovnih obdobjih prilagodijo na razmere v okolju le v okviru svojih genetskih predispozicij. Eden od dejavnikov, ki najbolj vplivajo na preoblikovanje združb in ekosistemov, je dostopnost življenjsko potrebnih snovi. Evolucijski odziv gliv na omejeno količino ogljika in dušika sta preučevala Goddard in Bradford (2003). Populacije se v določenem času prilagodijo na pomanjkanje snovi, vendar so prilagoditve lahko različno hitre, različno obsežne in imajo različne energetske zahteve. Posledica prilagoditve na precej specifične razmere pa je lahko tudi manjša možnost preživetja v drugih razmerah. Rezultati so pokazali, da so organizmi, ki so jih gojili z omejeno količino ogljika, za 8 odstotkov bolj vitalni v razmerah pomanjkanja ogljika, pri organizmih, ki so jih gojili v razmerah z omejeno količino dušika, pa niso zaznali razlike v vitalnosti, ko ga je primanjkovalo. Ko so primerjali vitalnost prvotnih organizmov in organizmov, prilagojenih na pomanjkanje ogljika, pri omejeni količini dušika, so ugotovili, da imajo v takih razmerah prvotni organizmi, ki niso prilagojeni na pomanjkanje ogljika, veliko prednost. Za organizme, ki so bili prilagojeni na pomanjkanje dušika in prvotne, neprilagojene organizme pa se je izkazalo, da v razmerah pomanjkanja ogljika med vitalnostjo obojih ni bistvenih razlik. Možna sta dva načina prilagoditve organizmov na pomanjkanje ogljika, in sicer povečana sposobnost privzemanja ogljika iz okolja ali manjša potreba po količini ogljika v biomasi za razmnoževanje. Kadar so na pomanjkanje prilagojeni in neprilagojeni organizmi imeli na voljo dovolj ogljika se je izkazalo, da so imeli prilagojeni višje koncentracije ogljika v biomasi. Dostopnost snovi torej lahko zelo vpliva na sposobnost mikroorganizmov, da te snovi čim bolje izkoristijo.

Vendar bi v okolju, kjer je omejena količina ogljika, dovolj pa je dušika, imele prednost rastline pred mikroorganizmi, saj bi bilo razmnoževanje le-teh omejeno z dostopnostjo ogljika (Goddard in Bradford, 2003).

Okolje, v katerem živijo mikroorganizmi, je lahko tudi odpadna voda v čistilnih napravah. Če se v odpadni vodi poviša koncentracija soli, združba aktivnega blata pa ni prilagojena na slane razmere, sta možnosti za ohranitev delovanja čistilne naprave dve, in sicer postopno prilagajanje združbe na slane razmere ali vcepitev halofilnih organizmov. Pri prilagajanju združbe aktivnega blata na slane razmere se halotolerantni organizmi v združbi prilagodijo na razmere povišane slanosti. Tak proces lahko traja dolgo, združba mikroorganizmov pa se v tem času spremeni, saj halotolerantni organizmi postanejo bolj številčni. Opazili so, da na spreminjanje sestave mikrobne združbe ob višanju koncentracije NaCl vpliva tudi kompleksnost substrata. V kompleksnih substratih se aktivnost in sestava združbe s povečanjem koncentracije soli precej spreminjata, pri enostavnih substratih pa višanje koncentracije NaCl ne vpliva tako močno na sestavo združbe mikroorganizmov. Vendar to velja za koncentracije soli do 2 odstotkov. (Lefebvre in sod., 2007).

Mikroorganizmi v prsti so izpostavljeni stalnemu nihanju vodnega potenciala. Te spremembe so lahko postopne, lahko pa se vrednost vodnega potenciala zelo hitro spremeni (poviša), na primer ob nenadnih padavinah po dolgotrajni suši. Z merjenjem sproščenega ogljika iz mikrobne biomase v nenadno namočeni prsti so ugotovili, da določen delež celic propade zaradi učinkov nenadnega povišanja vodnega potenciala. Pokazale so se razlike med stopnjo propada celic v različnih prsteh, zaradi različno odporne, oziroma prilagojene mikroflore. V okolju, ki je redkeje izpostavljeno nihanju vodnega potenciala, so bili učinki povišanja le-tega veliko bolj uničujoči, kot v okolju, kjer je nenadna namočenost suhe prsti pogost pojav. Torej se združba mikroorganizmov lahko prilagodi tudi na velika nihanja vodnega potenciala v prsti. V taki združbi prevladujejo mikroorganizmi, ki imajo mehanizme za preživetje takih sprememb (Kieft in sod., 1987).

2.5 Preučevanje sestave mikrobnih združb

2.5.1 Gojenje mikroorganizmov

Če želimo preučevati mikrobne združbe v točno določenih razmerah in morebitne odzive združb na točno določene spremembe razmer, moramo zagotoviti gojišča, ki so ustrezno sestavljena. Če želimo, da se bodo mikroorganizmi razmnoževali v gojišču, mora biti le-to sestavljeno iz snovi (hranil), ki jih preučevani organizmi lahko uporabljajo za rast in biosintezo novih celic. Nekaterim mikroorganizmom to lahko zagotovimo, tisti, ki so specializirani za določeno življenjsko okolje, pa potrebujejo zelo prilagojene razmere.

Mnogih mikrobov ni mogoče gojiti v umetnih razmerah. Za prokarionte je na primer ocenjeno, da jih poznamo manj kot en odstotek.

Mikroorganizmi, ki jih lahko gojimo (na primer *Escherichia coli*), potrebujejo za rast elemente, ki jih vsebujejo njihove celice. To so C (ogljik), H (vodik), O (kisik), N (dušik), S (žveplo), P (fosfor), K (kalij), Mg (magnezij), Ca (kalcij), in nekateri drugi, kot so elementi v sledovih. V gojišča teh navadno sploh ni potrebno dodati, saj so lahko prisotni v dovolj visoki koncentraciji že v vodi ali v sestavinah gojišča. Pomembni so kot kofaktorji encimov v celičnih reakcijah. Navadno so ti elementi Mn (mangan), Co (kobalt), Zn (cink), Cu (baker) in Mo (molibden) (Department of Bacteriology, 2007).

Mikroorganizmi, tako v naravi, kot v gojišču, potrebujejo vir energije (svetloba (fototrofni organizmi), organske snovi (heterotrofni organizmi), anorganske snovi (litotrofni organizmi)). Poleg tega pa so pomembni za uspešno rast tudi drugi dejavniki okolja, na primer koncentracija kisika, dostopnost vode, temperatura in pH.

Gojeni organizmi lahko za rast potrebujejo tudi rastne faktorje. To so esencialne snovi, ki jih organizmi ne morejo sami sintetizirati iz hranil v gojišču, kot so purini in pirimidini (potrebni za sintezo DNA in RNA), aminokisline (za sintezo beljakovin) ali vitamini (koencimi ali funkcionalne skupine določenih encimov) (Department of Bacteriology, 2007).

Poznamo različne tipe gojišč. Pri definiranih gojiščih je znana natančna kemijska sestava. Kompleksna gojišča pa vsebujejo sestavine biološkega izvora, na primer mlečni, krvni, mesni ali kvasni ekstrakt, zato njihova sestava ni popolnoma določena.

Posebno vlogo imajo bogatitvena gojišča, ki vsebujejo snov za spodbujanje rasti organizmov, ki to snov lahko tolerirajo ali celo uporabljajo. Bogatitveno gojišče za halofilne organizme, ki selektivno omogoča rast ekstremno halofilnim organizmom (*Halococcus*), vsebuje do 25 odstotkov NaCl. Taka koncentracija soli zavira rast ostalih prokariontov, halofilni organizmi pa jo zahtevajo za svojo rast (Department of Bacteriology, 2007).

Na rast in razmnoževanje mikroorganizmov v gojiščih pa vpliva tudi njihova medsebojna komunikacija, ki poteka v obliki izločanja in sprejemanja majhnih signalnih molekul. Tako imenovani quorum sensing (QS) je način zaznavanja gostote bakterijskih celic. Zaradi omejenega prostora, ki ga mikrobne populacije zavzamejo, se z večanjem populacije koncentrirajo tudi signalne molekule, ki sprožijo enake ali različne odzive celic. Ta mehanizem je koristen tudi za preprečevanje kompeticije med mikrobnimi združbami. Signalno molekulo definira povzročitev odziva populacije celic, ki je drugačen od siceršnjega obnašanja celic. QS je lahko vrstno specifičen ali pa medvrsten (March in Bentley, 2004).

Na življenje bakterijskih celic v gojišču (ali drugje) lahko vplivajo tudi virusi. Povečajo lahko smrtnost bakterij in fitoplanktona v morju ter vplivajo na procese v mikrobni zanki. V lizogenem stanju virus ne vpliva na življenje celice, v njej je le virusna DNA ali profag, ki se podvaja skupaj s podvajanjem celice (na primer bakterijske). Lizogena faza lahko traja več generacij, dokler ni profag aktiviran zaradi prisotnosti nekega stresnega ali mutagenega dejavnika (Cochran in sod., 1998) in povzroči propad celice. V mikrobni zankah se reciklira organski material in obnavljajo raztopljena hranila. Njeno delovanje je odvisno od dostopne energije, parazitov in plenilcev, ki odnašajo snovi iz zanke. Virusi lahko vplivajo na procese, ki jih opravljajo mikrobi v zanki, in tako vplivajo na potek kroženja elementov, dihanje sistema, vrstno sestavo, horizontalni prenos mikrobni genov in tako na vse, kar je povezano s temi procesi v ekosistemu (Stopar, 2008).

2.5.2 Izolacija DNA iz vzorcev

Za preučevanje mikrobni združb na podlagi DNA, je potrebno le-to najprej izolirati iz celic. To velja tako za preučevanja laboratorijsko gojenih organizmov, kot za preučevanje mikrobni združb iz okolja. Tudi postopki so zelo podobni. Neposredne metode temeljijo na bolj ali manj grobi razgradnji celic okoljskega vzorca in kasnejši ločitvi DNA od ostankov celic in ostalega materiala, pri posrednih metodah pa se pred izolacijo DNA iz celic le-te izloči iz vzorca. S slednjo metodo dobimo bolj čisto DNA z večjo molekulsko maso, vendar je navadno količina DNA manjša. Gabor in sod. (2003), ki so preučevali različne metode izolacije DNA iz okoljskih vzorcev, so prišli do ugotovitve, da so posredne metode 10- do 100-krat manj uspešne od neposrednih, kar se tiče količine DNA, vendar je bila raznolikost bakterijske DNA, pridobljena s posrednimi metodami in analizirana z metodo DGGE, večja. S posrednimi metodami so pridobili poleg bakterijske manj evkariontske DNA (manj kot 8 odstotkov, z neposrednimi metodami pa 61 – 93 odstotkov). Ugotovili so torej, da so za izdelavo kvalitetnih prokariontskih genskih bank bolj primerne posredne metode izolacije DNA.

2.5.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za pridobitev pomnoženih bakterijskih genov za 16S rRNA, je potrebno opraviti verižno reakcijo s polimerazo, kjer uporabimo prave oligonukleotidne začetnike (OZ). Če želimo pomnožene dele bakterijske DNA preučiti tudi z metodo denaturacijske gradientne gelske elektroforeze, kot je TTGE (gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom), moramo za zagotovitev stabilnosti PCR-produkta uporabiti enega od OZ s pripeto GC-spono na 3' koncu. Močne vezi med verigama v tej sponki onemogočajo popoln razcep pomnoženih obratno komplementarnih verig, zato je ločevanje različnih 16S rDNA z metodo TTGE bolj natančno. PCR poteka po točno določenem protokolu, ki zajema denaturacijo DNA (odvijanje, razcep), prileganje OZ in podaljševanje (sestavljanje

obratno komplementarne DNA). To se ciklično ponavlja in po določenem številu ponovitev dobimo veliko kopij želenega odseka DNA. Razlike v kvaliteti PCR produktov se pokažejo pri kasnejšem TTGE profilu, saj se lahko pojavijo dodatne lise, če je v procesu PCR prišlo do napake v nizanju nukleotidov. Zato je pomembna optimizacija PCR (in uporaba prave polimeraze) pred uporabo produktov. Uporaba polimeraze s kontrolnim branjem (proofreading), je najbolj primerna pred analizo pomnožene DNA v TTGE, saj prepreči pojav lis na nepravih mestih v profilu (Earl in sod., 2005). Tudi za karakterizacijo gliv so primerne molekularne metode, ki temeljijo na pomnoževanju določenega odseka DNA in njegovi nadaljnji analizi s TTGE ali drugimi tehnikami. Pri glivah je tak odsek lahko gen za 18S rRNA (Cornejo in sod., 2004). Same metode pa so zelo podobne kot pri analizi bakterijskih združb.

2.5.4 Gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom (TTGE)

Za preučevanje sestave mikrobnih združb poznamo več molekularnih tehnik. Tehnike, ki uporabljajo za določanje strukture združbe lastnosti določenih delov mikrobne DNA, predvsem njihov odziv na prisotnost denaturantov, so DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), kjer je v poliakrilamidnem gelu prisoten linearen gradient denaturanta (kemikalije), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), kjer je denaturant temperatura, ki se vzdolž gela razlikuje, in TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis), ki deluje na zelo podoben način, le da je gradientno naraščanje temperature določeno časovno. Pri TTGE in TGGE se PCR produkti na gelu ločijo zaradi linearnega temperaturnega gradienta (Nieguitsila in sod., 2007), saj fragmenti, ki smo jih pomnoževali, delno denaturirajo (verigi se razcepita do GC-spone) pri določeni temperaturi (odvisno od nukleotidnega zaporedja fragmenta DNA) in se zaradi tega na določeni razdalji ustavijo v poliakrilamidnem gelu, po katerem potujejo zaradi električne napetosti. Za analizo bakterijskih in glivnih združb smo se v diplomski nalogi odločili za uporabo tehnike TTGE, s katero lahko na enem gelu primerjamo profile združb iz več vzorcev in ugotavljamo spremembe v strukturi združb.

Z metodo TTGE lahko preučujemo razlike med združbami, na primer v vertikalnem profilu sedimenta, vodnega stolpca itd. Lahko pa preučujemo tudi spreminjanje združbe v vzorcu na istem vzorčnem mestu, vendar v časovnih razmikih (na primer vpliv letnega časa na združbo). Earl in sodelavci (2005) so ugotovili, da je za analizo združb z metodo TTGE, potrebno pred pomnoževanjem s PCR redčiti DNA 10- do 100-krat, kar pa lahko privede do izgube podatkov o nekaterih vrstah. Če opravljamo TTGE analizo združb iz različnih krajev ali ob različnem času na različnih poliakrilamidnih gelih, ni mogoče z gotovostjo potrditi, da lise, ki so podobno potovale v gelu, pripadajo istim vrstam. Če so na gelu dovolj zanesljive pozitivne kontrolne lise in dobimo kasneje kvalitetne rezultate nukleotidnih zaporedij, pa lahko precej natančno preučimo spreminjanje združbe v času in

tudi konstantno pojavljanje organizmov, ki kažejo visoko stopnjo sorodnosti. Lahko tudi izrežemo lise, kjer so fragmenti DNA organizmov, ki so v združbi kazali zanimiv razvoj, in jim določimo nukleotidno zaporedje. Intenzivnost lis, ki jih dobimo v TTGE profilu, kaže tudi na številčno prisotnost posameznega taksona v vzorcu (Muyzer in sod., 1993).

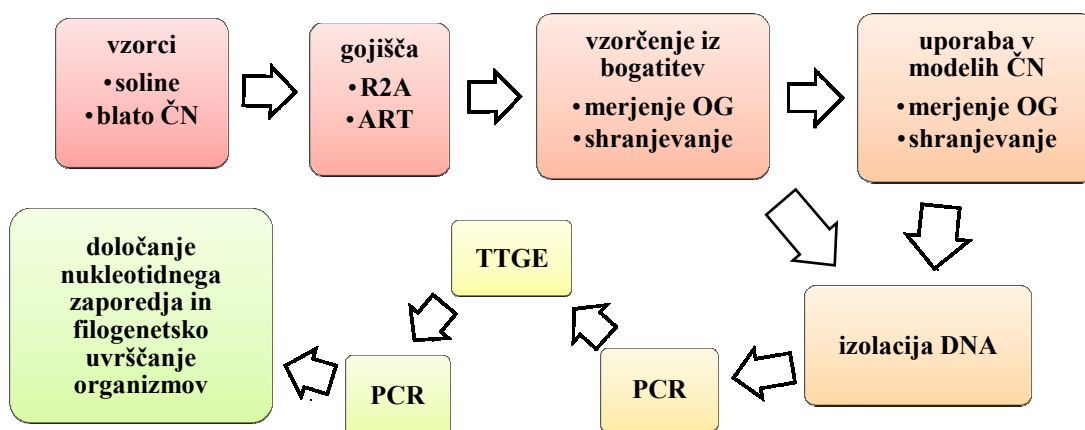
V živilski industriji imajo bakterije pomembno vlogo pri mnogih procesih, ki prispevajo h kemičnim in aromatskim spremembam živil, na primer sira. Da bi preučili vlogo posameznih bakterijskih vrst v kompleksnih združbah, ki delujejo v teh procesih, jih je potrebno identificirati, kar lahko naredimo tudi z metodo TTGE. Metode, ki temeljijo na preučevanju mikrobnih združb s štetjem gojenih mikroorganizmov, lahko dajo nepopolne ali celo napačne podatke, saj se nekatere bakterijske vrste ne morejo razmnoževati v odsotnosti živila, pri katerega preobrazbi sodelujejo, torej ne rastejo v gojišču. Prav tako pa je identifikacija organizmov z mikroskopskimi metodami možna le do nivoja rodu. TTGE je ena od hitrejših molekularnih metod za natančnejšo identifikacijo mikroorganizmov, ki ne zahteva gojenja celic. Za preizkus občutljivosti metode za detekcijo vrst z malo predstavniki (in malo DNA) v združbi, lahko primerjamo očiščena vzorca DNA dveh znanih vrst, katerih mešanico v različnih razmerjih analiziramo z metodo TTGE. Količina DNA ene od vrst v mešanici ostane enaka, medtem ko se količina DNA druge vrste v vsaki naslednji mešanici zmanjša. Tako določimo, kakšno je optimalno redčenje DNA pred nanosom na poliakrilamidni gel. S TTGE je mogoče zaznati prisotnost vrste v združbi, če količina njene DNA presega 1 odstotek celotne DNA združbe (Ogier in sod., 2002).

2.5.5 Določanje nukleotidnega zaporedja fragmentov DNA in filogenetsko uvrščanje organizmov

Lise, ki predvidoma predstavljajo za raziskavo pomembne vrste v združbi, je potrebno iz poliakrilamidnega gela po končani TTGE izrezati. DNA lahko očistimo in ponovno pomnožimo dele, ki so bili pomnoženi pred metodo TTGE. Tokrat uporabimo OZ brez GC spone. Earl in sodelavci (2005) so pridobljena nukleotidna zaporedja analizirali s programom BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI - National Center for Biotechnology Information), kjer so podatkovne baze nukleotidnih zaporedij znanih organizmov. Te so primerjali z nukleotidnimi zaporedji organizmov iz vzorcev, ki so jih tako uvrstili v sorodstvo z izdelavo sorodstvenih dreves. Nukleotidna zaporedja DNA iz lis, ki so prepotovale enako razdaljo v gelu, so pokazala 99,3- do 100-odstotno podobnost. Sicer pa so, glede na nukleotidna zaporedja, organizmi v sorodstvenem drevesu razporejeni v skupine med seboj bolj sorodnih (Earl in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

Praktični del raziskave je zajemal bogatitev organizmov iz solin in organizmov aktivnega blata v različnih gojiščih, iz katerih smo jemali vzorce in jim izmerili optično gostoto (OG). Koncentrirane smo shranili za nadaljnjo analizo. Obogatene solinske organizme smo vcepili v enega od modelov čistilnih naprav (MČN). Tudi v MČN smo merili OG in shranjevali vzorce za kasnejšo molekularno analizo. Iz izbranih vzorcev smo izolirali DNA, pomnožili bakterijske gene za 16S rRNA in glivne gene za 18S rRNA z reakcijo PCR, nato pa združbe analizirali z metodo TTGE. Fragmente DNA izbranih organizmov smo ponovno pomnožili in jim določili nukleotidno zaporedje. Tako smo določili filogenetsko pripadnost bakterij, ki so jim pripadali izbrani fragmenti 16S rDNA in gliv, katerih fragmente 18S rDNA smo izbrali.



Slika 1: poenostavljena shema poteka dela

3.1 Gojitvene tehnike

Za bogatitev organizmov, odpornih na povišano koncentracijo NaCl, smo uporabili tekoči gojišči R2A in ART z dodatkom NaCl, za primerjavo pa tudi gojišče ART (pri organizmih iz blata čistilne naprave tudi R2A) brez soli.

Sestava gojišč:

Gojišče R2A (za 1 liter gojišča) (Reasoner in Geldreich, 1985):

<u>Sestavina</u>	<u>količina</u>
Kvasni ekstrakt (BioMerieux, Francija)	500 mg
Bakto-pepton (Difco, Michigan, ZDA)	500 mg

Casamino kisline (Difco, Michigan, ZDA)	500 mg
Glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška)	500 mg
Škrob (Kemika, Zagreb, Hrvaška)	500 mg
K ₂ HPO ₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška)	300 mg
MgSO ₄ X 7H ₂ O (Merck, Darmstadt, Nemčija)	50 mg
Natrijev piruvat (Merck, Darmstadt, Nemčija)	300 mg
pH = 7,2	

Gojišče ART (za 1 liter gojišča) (Kosjek in sod., 2007)

<u>Sestavina</u>	<u>količina</u>
Kvas	130 mg
Bakto-pepton	130 mg
Mesni ekstrakt (Merck, Darmstadt, Nemčija)	130 mg
CH ₃ COONH ₄ (Merck, Darmstadt, Nemčija)	317 mg
NH ₄ Cl (Merck, Darmstadt, Nemčija)	40 mg
K ₂ HPO ₄	24 mg
KH ₂ PO ₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška)	8 mg
CaCO ₃ (kalcijev karbonat)	100 mg
MgCO ₃ (magnezijev karbonat)	100 mg
NaCl (natrijev klorid)	40 mg
FeSO ₄ X 7H ₂ O (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)	5 mg

Za pripravo gojišč z 1,5 odstotka NaCl, smo dodali 15 g NaCl na liter gojišča.

3.1.1 Bogatitev organizmov, odpornih na povišano koncentracijo NaCl

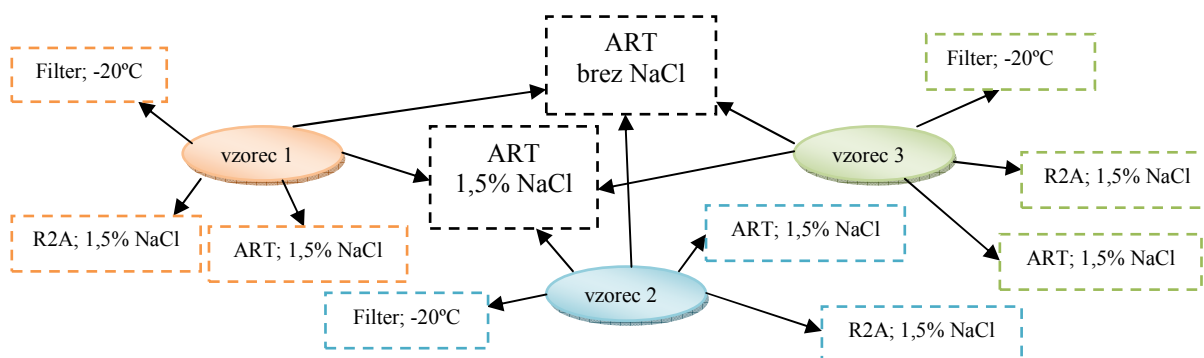
3.1.1.1 VZORCI IZ SOLIN

V laboratoriju smo v tri 500-mililitrske erlenmajerice nalili gojišče R2A z NaCl, v tri pa gojišče ART z NaCl. V 2-litrsko erlenmajerico smo nalili 1600 ml gojišča z dodanim

NaCl, v litrsko pa 700 ml gojišča brez NaCl. Vsa gojišča v erlenmajericah smo nato sterilizirali v avtoklavu. V gojiščih, v katera je bil dodan NaCl, je bilo le-tega 1,5 odstotka.

Vzorčenje solinskih organizmov je potekalo na treh lokacijah v Sečoveljskih solinah v septembru leta 2005. Vzorci so bili nabrani v sterilne posode, prevoz do laboratorija pa je potekal pri sobni temperaturi. Nato so bili do uporabe shranjeni na temperaturi 4°C.

Vse tri solinske vzorce smo z vodno črpalko prefiltrirali skozi filtre z 0,45 µm velikimi porami. Filtrirali smo po 50 ml posameznega vzorca. Po 2 filtra s posameznim vzorcem smo nato ob plamenu gorilnika prenesli v naslednji sterilni gojišči: 300 ml gojišča R2A z NaCl in 300 ml gojišča ART z NaCl. V gojišči ART v večjih erlenmajericah, od katerih je bil v eno dodan NaCl, drugo pa je bilo brez NaCl, smo dodali po en filter vsakega prefiltriranega vzorca. Tako smo v teh dveh gojiščih združili vse tri vzorce (Slika 2). Erlenmajerice z gojišči in vcepljenimi vzorci smo nato prenesli na stresalnik in gojili na sobni temperaturi pri 100 vrtljajih na minuto. Ta postopek smo za prvi solinski vzorec izvedli 18. novembra 2005, za drugi in tretji solinski vzorec ter združene vzorce pa 21. novembra 2005.



Slika 2: shema razporeditve solinskih vzorcev v različna gojišča

Po 18 dneh smo iz vsake bogatitve vzeli po 25 ml in to prenesli v sveža, sterilna gojišča z enako sestavo in volumnom. Nova gojišča z vcepki smo dali na stresalnik pri sobni temperaturi. Bogatenje v svežih gojiščih je potekalo nadaljnjih 6 tednov, stare bogatitve pa smo po nekaj dneh zavrgli.

3.1.1.2 VZORCI AKTIVNEGA BLATA

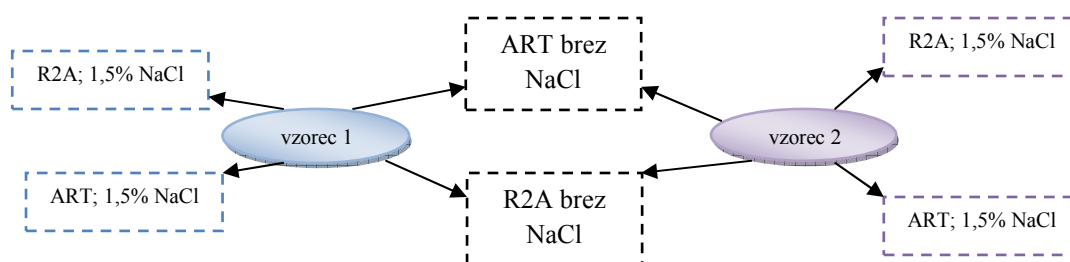
Sestava gojišč je bila enaka kot pri gojenju solinskih vzorcev, z razliko, da smo za gojenje organizmov aktivnega blata uporabili še gojišče R2A brez dodanega NaCl.

Pripravili smo šest 500-mililitrskih erlenmajeric. V dve erlenmajerici smo dali po 300 ml gojišča R2A z dodatkom NaCl, v dve smo nalili po 300 ml gojišča ART z NaCl, v eno 300

ml gojišča ART brez NaCl in še v zadnjo 300 ml gojišča R2A brez NaCl. Kjer je bil dodan NaCl, je bila njegova koncentracija 1,5-odstotna

Vzorčenje organizmov aktivnega blata biološke čistilne naprave je potekalo v oktobru 2005 na biološki čistilni napravi v Kopru.

Vzorca aktivnega blata smo koncentrirali z 20-minutnim centrifugiranjem pri 10.000 obratih na minuto. Posamezen vzorec smo 19. decembra 2005 vcepili v obe gojišči z dodanim NaCl, v vsako od gojišč brez NaCl pa smo vcepili oba izhodna vzorca aktivnega blata (Slika 3).



Slika 3: shema razporeditve vzorcev aktivnega blata v gojišča

Erlenmajerice z gojišči z dodanim NaCl in vcepljenimi vzorci smo nato prenesli na stresalnik in gojili na sobni temperaturi pri 100 vrtljajih na minuto.

3.1.1.3 Priprava vzorcev za nadaljnjo analizo in shranjevanje

Za izolacijo in analizo DNA smo iz vseh bogatitev (s solinskimi vcepki in vcepki organizmov aktivnega blata) dnevno ali na nekaj dni s steklenimi pipetami jemali po 25 ml bogatitve. Vzorce smo koncentrirali z 20-minutnim centrifugiranjem pri 10.000 obratih na minuto. Nato smo odlili supernatant, v usedlino smo dodali po 300 µl fosfatnega pufra (0,12 M), zmešali na vortex mešalu (Rotamix 545 MMH, Tehtnica Železniki) in prenesli v sterilne mikrocentrifugirke (Plastibrand, 1,5ml; Brand, Wertheim, Nemčija). Vzorce v mikrocentrifugirkah smo shranili v zamrzovalniku pri temperaturi -20°C. Vzorcem, ki so bili namenjeni nadaljnji uporabi v modelih čistilnih naprav, smo pred zamrznitvijo dodali glicerol, da ne bi prišlo do poškodb celic. Po vsakem četrtem odvzemu vzorca smo dodali po 100 ml svežega sterilnega gojišča, da smo ohranili enako prostornino gojišča.

Izhodne solinske vzorce smo pri temperaturi -20°C shranili na filtrih s prefiltriranimi vzorci.

Izhodna vzorca aktivnega blata smo shranili tako, da smo po centrifugiranju dodali v usedlini po 300µl fosfatnega pufra in ju prenesli v sterilni mikrocentrifugirki ter zmrznili.

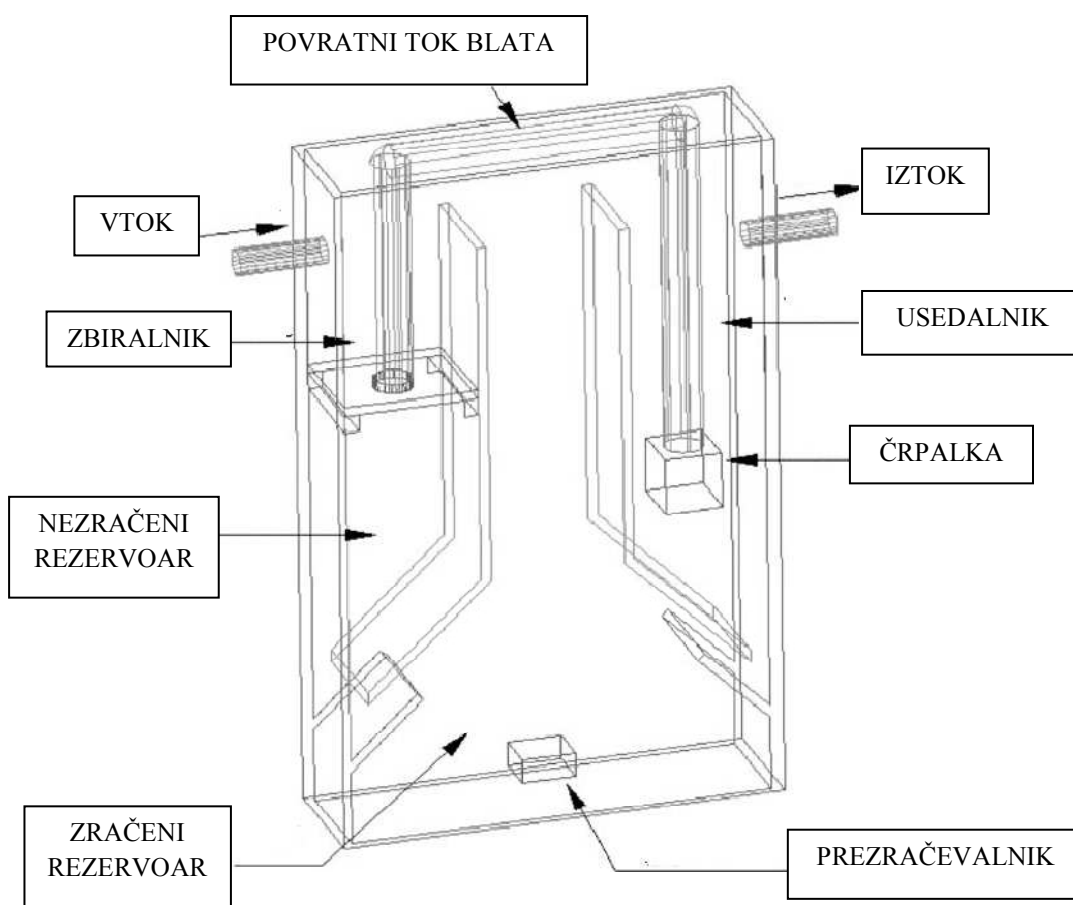
3.1.1.4 Merjenje optične gostote

V času bogatitve smo merili tudi gostoto celic v gojiščih, in sicer z merjenjem optične gostote (OG) pri valovni dolžini 600 nm s spektrofotometrom (Lambda Bio, UV/VIS; Perkin Elmer Corp., Analytical Instruments, Connecticut, ZDA). Po 1 ml gojišča smo prenesli v merilno kiveto in izmerili OG.

Merjenje OG pomeni merjenje zmanjšanja moči svetlobnega (fotonskega) žarka, ko le-ta pripotuje skozi snov, katere OG merimo, do detektorja. Več je v vzorcu delcev, ki absorbirajo svetlobo, manj fotonov pride do detektorja. Za merjenje gostote celic v tekočem gojišču merimo OG pri valovni dolžini 600 nanometrov (nm), saj pri tej valovni dolžini žarka ne ovirajo delci, ki so poleg celic prisotni v gojišču, torej je zmanjšanje moči žarka posledica prisotnosti živih celic. Rezultat je odvisen od razmerja med absorbanco (zadrževanjem) in transmitanco (prepuščanjem) svetlobe v vzorcu v merilni kiveti.

3.1.1.5 V MODELE ČISTILNIH NAPRAV VCEPLJENI VZORCI IZ SOLIN

Uporabljeni modeli čistilnih naprav so bili narejeni na Oddelku za vodarstvo Fakultete za gradbeništvo in geodezijo. V zbiralnik je teklo sveže gojišče (ART) po cevki, in sicer 2 litra na dan. Zaloga gojišča je bila 4 litre. S prezračevalnikom (aeratorjem) smo v zračeni rezervoar vpihovali zračne mehurčke, da so bili omogočeni aerobni procesi. Iz usedalnika v zbiralnik je, s pomočjo črpalke, tekel povratni tok, iz katerega smo tudi vzorčili za nadaljnje analize DNA (Slika 4).



Slika 4: shema modela čistilne naprave (Kosjek in sod., 2007)

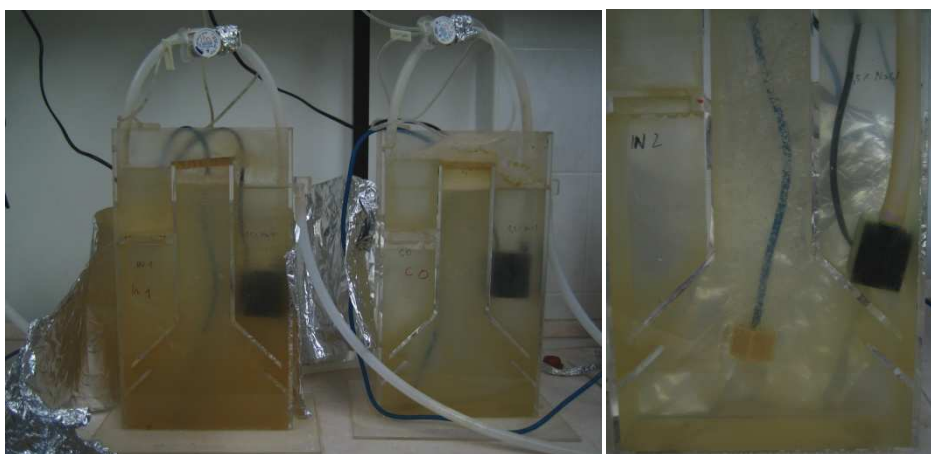
Solinska vzorca za vcepke v modela čistilne naprave IN2 in IN3 na Oddelku za vodarstvo Fakultete za gradbeništvo in geodezijo sta bila nabrana v juniju leta 2006 na dveh lokacijah v kristalizacijskih bazenih Sečoveljskih solin. Postopek nabiranja in prevoza je bil enak kot pri solinskih vzorcih za vcepitev v gojišča.

Nastavili smo 4 modele čistilnih naprav, v katere je teklo gojišče ART. V prve tri modele je teklo gojišče z dodanim 1,5-odstotnim NaCl, v četrtega pa s 17-odstotnim NaCl. Prvi model (C0) je bil kontrolen in vanj nismo vcepili organizmov. V drugi model (IN1) smo vcepili solinske organizme, ki smo jih predhodno bogatili v gojišču ART z 1,5 odstotka

NaCl in so bili shranjeni z dodatkom glicerola za boljšo ohranitev celic. V tretji in četrti model (IN2, IN3) smo direktno vcepili organizme, ki so bili nabrani v solinah in pred vcepljenjem niso bili v gojišču. V model smo jih vnesli v obliki solinske vode, in sicer v vsak model po 50 ml. Modele, gojišča in vanje vcepljene organizme prikazuje spodnja tabela. Uporabljena sol je bila iz Sečoveljskih solin. Gojišča, ki so tekla v modele čistilnih naprav, niso bila sterilna.

Tabela 1: gojišča in vcepki v modelih čistilnih naprav

MODEL	GOJIŠČE	VCEPEK
C0	ART; 1,5% NaCl	
IN1	ART; 1,5% NaCl	Predhodno 2 meseca gojeni organizmi v gojišču ART z 1,5% NaCl
IN2	ART; 1,5% NaCl	Solinski organizmi iz okolja
IN3	ART; 17% NaCl	Solinski organizmi iz okolja



Slika 5: modela C0 in IN1 ter podrobnejša slika modela IN2.

Tudi vzorce iz modelov smo koncentrirane zmrznili za nadaljnje analize, izmerili pa smo jim tudi optično gostoto pri 600 nm.

3.1.1.5.1 BPK₅ test, merjenje biokemijske potrebe po kisiku na vtoku in iztoku iz modelov

Metoda temelji na merjenju količine raztopljenega kisika (mg/l) v vodi pred in po petdnevni inkubaciji. Razlika v količini raztopljenega kisika nam pove, koliko kisika so mikroorganizmi v petih dneh porabili za oksidacijo organskih snovi.

BPK₅ test smo izvajali s titracijsko (Winklerjevo) metodo.

Titracijska metoda temelji na kemijski fiksaciji prostega kisika v vzorcu, ki ga testiramo. Kisik oksidira manganov hidroksid. Iz kalijevega jodida, ki je dodan, se v kislem pH sprošča jod. Količina sproščenega prostega joda (določimo jo s titracijo z natrijevim

tiosulfatom) pa je kemijsko enaka, kot količina kisika, raztopljenega v vzorcu (Urbanič in Toman, 2003).

Reagenti: Obarjalna raztopina (NaOH, KI, NaN_3)
Raztopina manganovega (II) klorida ($\text{MnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
Žveplova (VI) kislina (H_2SO_4)
Raztopina natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
Škrobovica

Kratek opis metode BPK_5 za posamezen model:

- Winklerjevi steklenici napolnimo, eno z vzorcem gojišča pred vtokom v model in drugo z vzorcem pred iztokom iz modela ter ju zapremo.
- Dodamo NaOH in KI ter MnCl_2 .
- Ponovno zapremo steklenici.
- Po vsedanju oborine, odstranimo 2/3 supernatanta.
- Dodamo 5ml H_2SO_4 .
- Winklerjevo steklenico ponovno zapremo in premešamo vsebino s stresanjem, da se oborina raztopi.
- Dodamo škrobovico.
- Sledi titriranje z natrijevim tiosulfatom dokler se vzorec enakomerno ne razbarva.
- Iz volumnov dodanih reagentov, volumna Winklerjeve steklenice in volumna ob titraciji porabljenega natrijevega tiosulfata (ter njegove normalitete) izračunamo vsebnost raztopljenega kisika.

3.2 Molekularne tehnike

3.2.1 Izolacija deoksiribonukleinske kisline (DNA)

Za izolacijo smo izbrali vzorce, ki so bili odvzeti približno v 2-tedenskih presledkih.

DNA smo izolirali po direktni metodi ekstrakcije s kompletom SmartHelixTM (Inštitut za fizikalno biologijo (IFB) d.o.o.), ki temelji na mehanski dezintegraciji celic, brez njihove predhodne izolacije iz vzorca.

Material, ki ga potrebujemo za izolacijo DNA po tej metodi je naslednji:

- SmartHelixTM mikrocentrifugirke (30 kosov)
- Raztopine: Sol I (10 ml), Sol II (35 ml), Sol III (2-krat 35 ml), Sol IV (8 ml), Sol V (50 ml) in Sol VI (25 ml) (SmartHelixTM DNA Extraction Kit, IFB d.o.o.).

Postopek za uporabo te metode je naslednji:

- Vzorec se suspendira v pufru, ki je sestavljen iz detergenta in reagenta s fenolom.
- Suspendiran vzorec dodamo v mikrocentrifugirko s steklenimi kroglicami in stresamo 2 minuti pri 20 do 32 Hz (Cell Disruptor ver. 1.0).
- Sledi 5-minutno centrifugiranje pri pospešku $10.000 \times g$ na sobni temperaturi.
- Po centrifugiranju prenesemo vodno fazo (ekstrakt A) v sterilno mikrocentrifugirko, odstranimo pa tudi spodnjo, rumeno fazo. Mikrocentrifugirko z ekstraktom shranimo na ledu.
- V mikrocentrifugirko s steklenimi kroglicami in vzorcem dodamo 400 μ l Sol II in 375 ml Sol III.
- Vsebino premešamo na mešalu vorteks.
- Sledi ponovno stresanje, centrifugiranje, odstranjevanje vodne in rumene faze, dodajanje Sol II in Sol III ter mešanje. Vse postopke iz te točke potem ponovimo še enkrat.
- Po zadnjih dveh odvzemih vodne faze dobimo še ekstrakta B in C, ki ju združimo in shranimo na ledu.
- V mikrocentrifugirke z ekstraktom A in združenima ekstraktoma B in C dodamo Sol III.
- Premešamo na mešalu vorteks pri maksimalni hitrosti.
- Centrifugiramo 5 minut pri pospešku $10.000 \times g$ na sobni temperaturi
- Vodno fazo prenesemo v nove mikrocentrifugirke in določimo volumen tega očiščenega ekstrakta. Če le-ta presega 450 μ l, ga razdelimo v dve mikrocentrifugirki. Čiščenje lahko ponovimo še dvakrat, če ocenimo, da je to potrebno (če vzorec ni bister).
- V mikrocentrifugirko z očiščenim ekstraktom dodamo Sol IV, in sicer četrtno volumna vsebine. V isto mikrocentrifugirko dodamo še Sol V, in sicer dvakratni volumen izmerjenega očiščenega ekstrakta.
- Vsebino premešamo z obračanjem mikrocentrifugirke.
- Tako pripravljene pustimo mikrocentrifugirke pri temperaturi -18 do -80°C vsaj 30 minut, lahko pa tudi več dni.
- Temu sledi 30-minutno centrifugiranje pri temperaturi 4°C in pri pospešku $20.800 \times g$.
- Odlijemo supernatant in dodamo 750 μ l Sol V.
- Centrifugiramo 15 minut pri temperaturi 4°C in pri pospešku $20.800 \times g$.
- Odlijemo supernatant in usedlino posušimo.
- Ko je suha, jo raztopimo v najmanj 20 μ l sterilne vode brez DNA, RNA, DNaze in RNaze.
- DNA shranimo pri temperaturi -20 do -80°C (SmartHelixTM DNA Extraction Kit, IFB d.o.o.).

Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Iz vsakega vzorca smo vzeli po 5 µl raztopljenega izolata, mu dodali 1 µl barvila za elektroforezo in ga nanесли v jamico na 1-odstotnem agaroznem gelu (0,5 g agaroze (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA) in 50 ml 0,5-kratnega pufru TBE (45 mM Tris baza, 45 mM boroва kislina, 1 mM EDTA pH 8)) z dodanim etidijevim bromidom. V eno jamico smo dali 2 do 2,5 µl lestvice (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas inc., Burlington, Kanada) in 1 µl barvila. Gel je bil potopljen v 0,5-kratni pufer TBE, elektroforeza je potekala pri 113 voltih (V) (Consort E 143). Po končani elektroforezi smo gel slikali pod UV-svetlobo s sistemom UVI photo (Uvitec, Cambridge, Velika Britanija).

3.2.2 ANALIZA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB

Z metodo SmartHelix™ (IFB d.o.o.) izolirano DNA smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

3.2.2.1 Pomnoževanje dela gena za 16S rRNA s PCR

Pomnožili smo del DNA, ki določa večino zaporedja za 16S rRNA pri bakterijah. Uporabili smo OZ U968(5'-ACGCGAAGAACCTTAC-3')-GC, ki ima pripeto GC-spono, sestavljeno iz nukleotidnega zaporedja, bogatega z guanidin in citozin monofosfati. GC-spona je za boljše ločevanje pri nadaljnji analizi z metodo TTGE, saj zaradi močnih vezi prepreči popolno razpiranje vijačnic na enem koncu. Drugi OZ je bil L1401 (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3') (Gabor in sod., 2003). Za vsak vzorec smo naredili dve enaki reakciji PCR, kasneje pa smo produkte obeh reakcij združili. Reakcijska mešanica je imela za vsak vzorec volumen 24 µl, dodatnih 24 µl mešanice, ki ji nismo dodali DNA, je predstavljalo kontrolo. Sestava mešanice (24 µl) je bila naslednja:

<u>Sestavina</u>	<u>količina</u>
H ₂ O (bidestilirana, sterilna)	17,55 µl
10 - kratni pufer za PCR (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	2,5 µl
MgCl (25 mM) (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	1,5 µl
dNTP (20 mM) (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	0,25 µl
oligonukleotidni začetnik U968-GC (10pmol/µl)	1 µl
oligonukleotidni začetnik L1401(10pmol/µl)	1 µl
polimeraza <i>Taq</i> (5U/µl) (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	0,2 µl

Sestavo mešanice optimiziramo za vzorce, katerih DNA se težje pomnožuje. Spreminjamo lahko količino polimeraze *Taq*, ali pa dodamo goveji serumski albumin (BSA), ki stabilizira polimerazo *Taq*.

V 24 µl mešanice za PCR v 200-mikrolitrskih mikrocentrifugirkah smo, z izjemo kontrolne mikrocentrifugirke, dodali po 1 µl raztopljene DNA, redčene 1:15 oz 1:30. Mikrocentrifugirke smo nato vstavili v napravo za PCR (Mastercycler ep gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija). Mešanje sestavin in razdeljevanje v mikrocentrifugirke je potekalo v laminariju, ki je bil predhodno razkužen z etanolom in najmanj 15 minut osvetljen z UV svetlobo.

Program poteka PCR je prikazan v spodnji tabeli:

Tabela 2: program za pomnoževanje 16S rDNA pri bakterijah (Lapanje, 2005).

PROCES	TEMPERATURA	ČAS	PONOVITVE
predhodna denaturacija	92°C	3 minute	
denaturacija	92°C	30 sekund	} 35 - krat
prileganje	54°C	30 sekund	
podaljševanje	68°C	1 minuta	
končno podaljševanje	72°C	7 minut	
hlajenje	4°C		

Da smo preverili uspešnost pomnoževanja DNA, smo produkte po vsaki končani reakciji vnesli na 1-odstotni agarozni gel z dodanim etidijevim bromidom. V prvo jamico gela smo nanесли lestvico (Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas inc., Burlington, Kanada) in 1µl barvila. Elektroforeza je potekala pri napetosti 113 V, gel je bil potopljen v 0,5-kratnem pufru TBE. Po elektroforezi smo gel slikali na UV-svetlobi s sistemom UVI photo (Uvitec, Cambridge, Velika Britanija).

Po dveh končanih reakcijah in preverjanju uspešnosti smo oba dela posameznega vzorca združili in oborili z etanolom in amonijevim acetatom ter posušili ob gorilniku. S tem smo dobljeno DNA koncentrirali. Suho DNA smo shranili pri temperaturi -20°C.

3.2.2.2 TTGE – gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom (temporal temperature gradient gel electrophoresis) za analizo bakterijskih združb

Priprava 30 mililitrov 8-odstotnega poliakrilamidnega gela (Lapanje, 2005):

- Natehtamo 14,4 g uree (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA), jo dodamo v merilni valj in dodamo destilirano vodo do 23 ml.
- Merilni valj prenesemo v toplo kopel, da se urea bolje raztopi.

- Raztopino nato mešamo z magnetnim mešalom in dodamo 6 ml 40-odstotne raztopine poliakrilamida/bisakrilamida (37,5:1) (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA) in 0,75 ml 50-kratnega pufra TAE (2M Tris baza, 1M očetna kislina, 50 mM EDTA, pH 8).
- Mešanico prelijemo v vodno črpalko in izsesamo zračne mehurčke (degaziramo).
- Dodamo 30 μ l TEMED (N,N,N',N' – Tetrametiletilendiamin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA) in 300 μ l 10-odstotnega amonijevega persulfata, hitro premešamo in vlijemo s pipeto v režo (1mm) med stekleni plošči, ki smo ju prej razmastili in namestili v nosilec.
- Pustimo, da gel polimerizira 2 uri

V elektroforezni banjici pripravimo 7 litrov 1,25-kratnega pufra za elektroforezo in ga segrejemo.

Priprava vzorcev, nanašanje in potek TTGE:

K shranjeni DNA posameznega vzorca, pridobljeni po PCR, smo dodali 3,5 μ l destilirane vode (ali pufra TE) in 3,5 μ l barvila za TTGE (vodna raztopina, 0,05 odstotka bromofenol modrega, 0,05 odstotka ksilen cianola, 70 odstotkov glicerola). V primeru, da nismo nanесли na gel celotnega vzorca, smo količino dodane vode (oziroma pufra) in barvila prilagodili tako, da je bilo razmerje pred nanosom 1:1. Pripravili smo še po 5 μ l lestvice λ /PstI (Fermentas, Vilnius, Litva), ki smo ji dodali po 5 μ l barvila. Gel smo z nosilcem namestili v ogreto elektroforezno banjico s pufrom. Prižgali smo črpalko, da je elektroforezni pufer zalil jamice v gelu. V začetno in končno jamico smo dali po 10 μ l barvila. V drugo, predzadnjo in eno izmed vmesnih jamic smo dali lestvico z barvilom. Od tretje jamice naprej smo s stekleno brizgalko (Hamilton Company, Reno, Nevada, ZDA) vnašali vzorce raztopljene DNA z dodanim barvilom. Po nanosu vseh vzorcev smo segreli banjico na začetno temperaturo (55°C) za TTGE. Vir napetosti (Bio-Rad Power Pac Basic, Biorad, Kalifornija, ZDA) smo nastavili na 20 voltov (V) in za 15 minut prižgali napravo. Po tem času smo nastavili napetost na 70V, naravnali končno temperaturo (69°C) in spreminjanje temperature v času poteka elektroforeze za 0,7°C/h. Prižgali smo tudi črpalko za kroženje pufra v banjici. Pri takih razmerah je tekla elektroforeza 20 ur.

Po končani elektroforezi smo gel prenesli v banjico za barvanje in ga barvali 20 minut z barvilom SYBR green (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA; 10 μ l v 100 ml destilirane vode,). Nato smo gel sprali z vodo in ga slikali na UV-svetlobi s sistemom UVI photo (Uvitec, Cambridge, Velika Britanija).

Iz gela smo na transiluminatorju (LKB 2011 Macrovue) s sterilnim skalpelom izrezali lise in jih shranili pri temperaturi -20°C.

3.2.3 ANALIZA GLIVNIH ZDRUŽB

Z metodo SmartHelixTM (IFB d.o.o.) izolirano DNA smo pomnožili s PCR:

3.2.3.1 Pomnoževanje dela gena za 18S rRNA s PCR

Za analizo združb gliv iz vzorcev smo pomnoževali del gena, ki določa zaporedje za 18S rRNA pri glivah. Del gena, velik 400 bp, vgnezden znotraj 550-600 bp velike regije, smo pomnoževali s polvgnezdeno reakcijo PCR, pri kateri sta za pridobitev zelenih fragmentov za vsak vzorec potrebni 2 zaporedni reakciji PCR. V prvi dobimo pomnožke večje regije, le-te razredčene prenesemo v drugo reakcijo, kjer uporabimo en OZ enak kot v prvi PCR, drugega pa nadomestimo z OZ, ki prepozna zaporedje znotraj regije iz prve PCR. S polvgnezdeno PCR zmanjšamo možnost pomnoževanja neželenih regij, saj je malo verjetno, da bi v drugo reakcijo prenesli dele genoma, ki bi jih OZ prepoznali kot vezavno mesto in ne bi bila prava vezavna mesta za pomnožitev dela 18S rDNA, ki ga želimo pomnožiti. OZ, ki smo jih uporabili, so EF4 v obeh reakcijah, Fung5 v prvi reakciji PCR in NS2 (5'-GAATTACCGCGGCTGCTGGC-3')-GC s pripeto GC-spono v drugi reakciji PCR (Nieguitsila in sod., 2007). EF4 (5'-GGAAGGGRTGTATTTATTAG-3') in Fung5 (5'-GTAAAAGTCCTGGTTCCCC-3') sta OZ, ki sta bila razvita za zmanjšanje možnosti pomnožitve evkariontske 18S rDNA, ki ne pripada glivam, saj je sicer podobnost v tej regiji med glivami in drugimi evkarionti zelo velika (Smit in sod., 1999). Reakcijska mešanica je imela volumen 49 µl za posamezen vzorec, dodatnih 49 µl pa je bilo namenjenih kontroli. Sestava mešanice za posamezen vzorec je bila naslednja:

<u>Sestavina</u>	<u>količina</u>
Bidestilirana sterilna voda	36,7 µl
10 - kratni pufer za PCR (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	5 µl
MgCl ₂ (25mM; Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	4 µl
Oligonukleotidni začetnik EF4	1 µl
Oligonukleotidni začetnik Fung5 (PCR 1) / NS2-GC (PCR 2)	1µl
dNTP (20 mM) (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	1µl
Polimeraza <i>Taq</i> (5U/µl; Applied Biosystems, Foster City, ZDA)	0,3 µl

V vodi raztopljeno DNA smo redčili 1:30 in v mešanico prve PCR reakcije vnesli 1 µl redčitve, v mešanico druge reakcije pa 1 µl pomnožka iz prve PCR reakcije. Pripravo in razdeljevanje mešanice smo izvajali v sterilnem laminariju. DNA smo vnašali ob plamenu gorilnika. Mikrocentrifugirke z mešanico in DNA smo vstavili na ploščo naprave za PCR (Mastercycler ep gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija). Za reakciji sta bila programa naslednja:

Tabela 3: program za pomnoževanje glivne 18S rDNA

PROCES	PCR 1	PCR 2	ČAS	PONOVI
	TEMPERATURA	TEMPERATURA		
predhodna denaturacija	94°C	94°C	3 minute	40 - krat
denaturacija	94°C	94°C	1 minuta	
prileganje	48°C	50°C	1 minuta	
podaljševanje	72°C	72°C	3 minute	
končno podaljševanje	72°C	72°C	10 minut	
hlajenje	4°C	4°C		

Po končani drugi reakciji smo uspešnost preverili z nanosom pomnožka na 1-odstotni agarozni gel z etidijevim bromidom in elektroforezo pri 113V. Na gel smo nanесли tudi lestvico (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas inc., Burlington, Kanada). Gel smo nato slikali (UVI photo (Uvitec, Cambridge, Velika Britanija)).

Za vsak vzorec smo naredili dve PCR 2 reakciji (z OZ EF4 in NS2-GC), nato pa smo produkte obeh združili in precipitirali z amonijevim acetatom in etanolom, da smo dobili koncentriran produkt. Tega smo posušili in shranili pri temperaturi -20°C.

3.2.3.2 Gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom (TTGE) za analizo glivnih združb

S tehniko TTGE smo analizirali glivne združbe iz enakih gojišč kot bakterijske združbe. Za glive in njihovo 18S rDNA smo uporabili prilagojen protokol poteka TTGE, v osnovi pa je bila metoda enaka. Pomnožene fragmente, pridobljene z reakcijo polvgnezdene PCR smo nanесли na poliakrilamidni gel in izvajali elektroforezo 20 ur. Za glivne združbe smo napetost elektroforeze nastavili po 15 minutah začetne napetosti 20V na 113V. Začetna temperatura TTGE je bila tu 44°C, končna pa 58°C.

Postopki priprave poliakrilamidnega gela, pufra za elektroforezo (1,25-kratni TAE), naprave za elektroforezo (D-code, Biorad, Hercules, Kalifornija), vzorcev za nanašanje in končnega izrezovanja lis so enaki kot pri TTGE za analizo bakterijskih združb.

3.2.4 Ekstrakcija in pomnoževanje fragmentov DNA izbranih lis, izrezanih iz poliakrilamidnega gela

Izbrane izrezane koščke gela smo prelili s 100 µl sterilne bidestilirane vode in pustili čez noč v hladilniku. S PCR smo pomnoževali 100-krat redčen ekstrakt DNA. Reakcija PCR je potekala po istem postopku kot pred analizo združb z metodo TTGE. Razlika je bila v oligonukleotidnih začetnikih, ki so bili tukaj brez pripetega GC-repa. V postopku pomnoževanja DNA smo optimizirali redčenje in sestavo mešanice za reakcijo PCR. Glavno DNA smo pomnoževali s PCR reakcijo, kjer smo uporabili OZ EF4 in NS2. V začetnih poskusih pomnoževanja DNA s PCR smo uporabljali polimerazo *Taq*, pufer in magnezijev klorid podjetja Fermentas inc., (Burlington, Kanada). Pomnoževanje fragmentov 18S rDNA je bilo precej uspešno, medtem ko se fragmenti 16S rDNA v tej fazi niso dobro pomnoževali. Zato smo v kasnejših poskusih uporabili polimerazo *Taq*, pufer in magnezijev klorid podjetja Applied Biosystems (Foster City, ZDA). Pomnoževanje s tem encimom je pokazalo boljše rezultate pomnoževanja fragmentov 16S rDNA. Optimizacija postopka pomnoževanja je zajemala tudi znižanje temperature prileganja.

Po končanem pomnoževanju fragmentov 16S rDNA in 18S rDNA smo produkte pomnoževanja s PCR poslali v podjetje MacroGen v Korejo, kjer so določili nukleotidno zaporedje fragmentov ki smo jih uporabili za ugotavljanje sorodstva organizmov. Sorodna nukleotidna zaporedja smo iskali v medmrežnih bazah (Ribosomal Database Project (Cole & Cole, 2007) in NCBI/BLAST (National Center for Biotechnology Information (NCBI 2008)).

Podatke o nukleotidnih zaporedjih smo pregledovali v programu FinchTV 1.4.0 (Geospiza Inc.).

3.3 Uporabljene kemikalije in oprema

3.3.1 kemikalije

GOJITVENE TEHNIKE

- kvasni ekstrakt (BioMerieux, Francija)
- Bakto-pepton (Difco, Michigan, ZDA)
- Casamino kisline (Difco, Michigan, ZDA)
- Glukoza (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- Škrob (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- K₂HPO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- MgSO₄ X 7H₂O (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Natrijev piruvat (Merck, Darmstadt, Nemčija)

- Mesni ekstrakt (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- NH_4Cl (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvaška)
- CaCO_3
- MgCO_3
- NaCl
- $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- Glicerol
- Fosfatni pufer (0,12 M)

BPK₅ TEST

- Obarjalna raztopina (NaOH , KI , NaN_3)
- Raztopina manganovega (II) klorida ($\text{MnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
- Žveplova (VI) kislina (H_2SO_4)
- Raztopina natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- Škrobovica

IZOLACIJA DNA

- 0,5-kratni pufer TBE (45 mM tris baza, 45 mM borova kislina, 1 mM EDTA pH 8)
- Agarozna (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- Etidijev bromid
- Lestvica (Gene Ruler, 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas inc., Burlington, Kanada)

AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

- Pufer TBE
- 1-odstotni agarozni gel
- Etidijev bromid (10 mg/ml)

PCR

- 10-kratni pufer za PCR (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)
- MgCl_2 (25 mM) (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)
- dNTP (20 mM) (Applied Biosystems, Foster City, ZDA)
- OZ U968-GC (10 pmol / μl)
- OZ U968 (10 pmol / μl)
- OZ L1401 (10 pmol / μl)
- OZ EF4 (10 pmol / μl)
- OZ Fung5 (10 pmol / μl)
- OZ NS2-GC (10 pmol / μl)

- OZ NS2 (10 pmol / μ l)
- Polimeraza *Taq* (5U/ μ l) (Applied Biosystems, Foster City, ZDA in Fermentas inc., Burlington, Kanada)
- Goveji serumski albumin (BSA)

OBARJANJE PRODUKTOV

- Etanol (96-odstotni in 80-odstotni)
- Amonijev acetat (10 M)

TTGE

- Pufer TE (Tris baza (10 mM), pH 7,5 in EDTA (1 mM))
- Pufer TAE (Tris baza (2 M), očetna kislina (1 M), EDTA (50 mM) pH 8)
- Urea (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- Poliakrilamid/bisakrilamid (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- 50-kratni pufer TAE (2 M tris baza, 1 M očetna kislina, 50 mM EDTA pH 8)
- TEMED (N,N,N',N' – Tetrametiletilendiamin, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)
- 10-odstotni amonijev persulfat
- Barvilo za TTGE (vodna raztopina, 0,05 odstotka bromofenol modrega, 0,05 odstotka ksilen cianola, 70 odstotkov glicerola)
- Lestvica λ /PstI (Fermentas, Vilnius, Litva)
- Barvilo SYBR green (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA)

3.3.2 Oprema

GOJITVENE TEHNIKE

- Erlenmajerice
- Avtoklav
- Filtri (0,45 μ m velike pore)
- Vodna črpalka
- Gorilnik
- Stresalnik
- Centrifuga
- Vortex mešalo
- 1,5-mililitrske mikrocentrifugirke
- Zamrzovalnik
- Spektrofotometer
- Kivete
- Modeli čistilnih naprav

IZOLACIJA DNA

- Komplet SmartHelixTM (IFB d.o.o.)

AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA

- Elektroforezna banjica in stojalce za gel
- Vir napetosti za elektroforezo
- Transiluminator in program za slikanje gelov

PCR

- Laminarij z UV-lučjo
- 200 mikrolitrne mikrocentrifugirke za PCR
- Naprava za PCR (Mastercycler ep gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Nemčija)

TTGE

- Merilni valj
- Topla kopel
- Magnetno mešalo
- Vodna črpalka
- Steklene plošče za gel in nosilci
- Naprava za TTGE z virom napetosti (D-code, BioRad, Kalifornija, ZDA)
- Transiluminator

4 REZULTATI

4.1 Priprava vcepka in merjenje rasti mikroorganizmov

Za pripravo učinkovitega vcepka mikroorganizmov smo morali le-te gojiti v razmerah, na katere morajo biti prilagojeni, da lahko nemoteno razgrajujejo organske snovi v čistilni napravi. Po določenem času v bogatitvenem gojišču se mikrobna združba preoblikuje tako, da v njej prevladujejo organizmi, ki jim take razmere ustrezajo.

Za ugotavljanje odziva združb na razmere v gojiščih, smo merili optično gostoto (OG), ki nam da podatek o tem, ali se mikroorganizmi v gojišču razmnožujejo oziroma imajo dovolj hrane in jim razmere ustrezajo. Če OG pada, je to lahko znak, da organizmi propadajo, oziroma se ne razmnožujejo, drug razlog pa je lahko kosmičenje mikroorganizmov in usedanje kosmov. Posledica je manjše število razpršenih mikroorganizmov, ki sicer prispevajo k višji izmerjeni OG.

Podatek o nihanju optične gostote nam ne prikaže sprememb v sestavi združbe, ki se dogajajo med procesom prilagajanja na nove razmere, temveč le omogoča spremljanje nihanja številčnosti populacije v gojišču.

4.1.1 Rastne krivulje

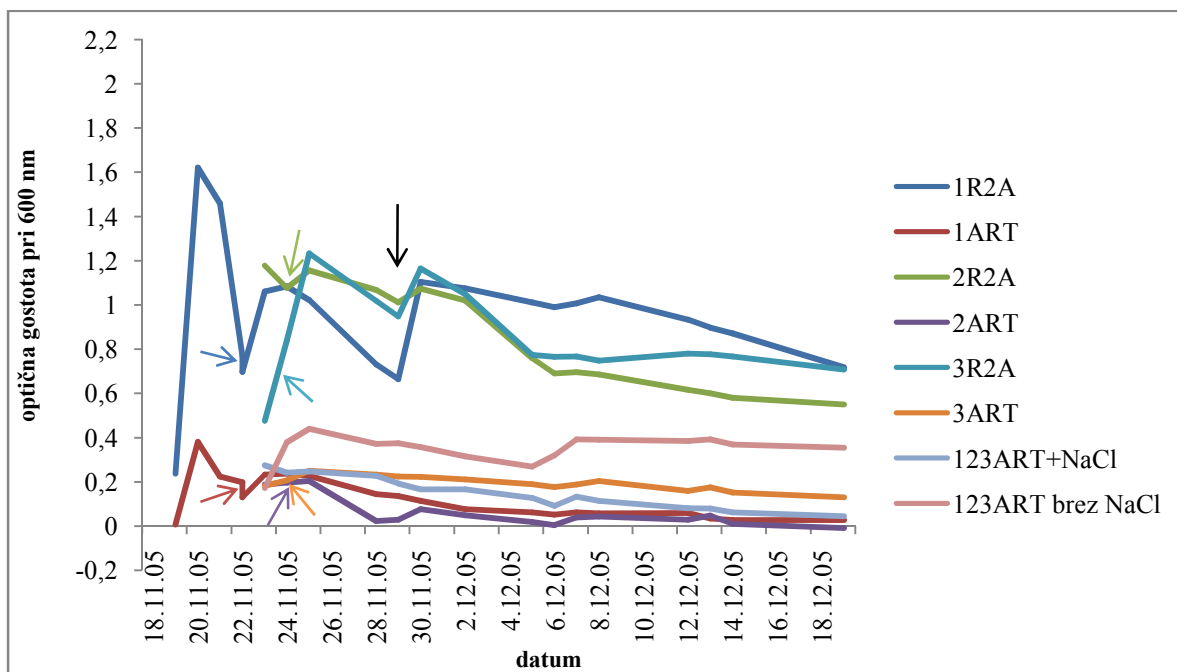
4.1.1.1 BOGATITEV SOLINSKIH MIKROORGANIZMOV

Gojišči, v kateri smo vcepili prvi vzorec solinske vode, smo poimenovali 1 R2A in 1 ART, gojišči z drugim solinskim vzorcem sta bili 2 R2A in 2 ART, s tretjim pa 3 R2A in 3 ART. Bogatitve z združenimi solinskimi vzorci smo poimenovali 123 ART+NaCl (gojišče ART z 1,5 odstotka NaCl) in 123 ART brez NaCl (gojišče ni imelo dodane soli). Gojišče brez soli smo uporabili za vpogled v dogajanje v združbi solinskih organizmov, ki jih gojimo v razmerah brez soli.

Pri vseh merjenjih je bila opazno večja OG v R2A bogatitvenih z gojiščih, v primerjavi z ART (Slika 6). Po prvem dodatku svežega gojišča je bila v vseh primerih naslednji dan izmerjena višja OG, vendar je bila razlika bolj izrazita v R2A gojiščih. Po drugem dodatku svežega gojišča je bila OG v vseh R2A bogatitvah in bogatitvi 2 ART večja, v vseh ostalih ART bogatitvah, pa je padla.

Za gojišči 1 R2A in 1 ART smo četrti dan izmerili OG pred in po dodatku svežega gojišča. Isti dan po dodatku gojišča je OG padla, naslednji dan pa je bil zabeležena večja OG oziroma povišanje števila mikroorganizmov (Slika 6).

V vseh gojiščih smo izmerili najvišja vrednost OG v prvih štirih dneh po vcepitvi organizmov v gojišče (Slika 6).



Slika 6: spreminjanje optične gostote bogatitev, z vcepljenimi organizmi iz vode solin.

Barvne puščice označujejo dodatek 100 ml svežega gojišča v posamezno gojišče, črna puščica pa kaže dodatek po 100 ml svežega gojišča v vsa gojišča. Uporabljeni sta bili gojišči ART in R2A. Številke 1, 2 in 3 označujejo vcepljene vzorce iz solin, pripis „brez NaCl” pomeni, da je bilo gojišče brez soli, v ostala gojišča pa je bil dodan NaCl v deležu 1,5 odstotka. 6. decembra smo po 25 ml iz vsakega gojišča prenesli v sveže gojišče z enako sestavo.

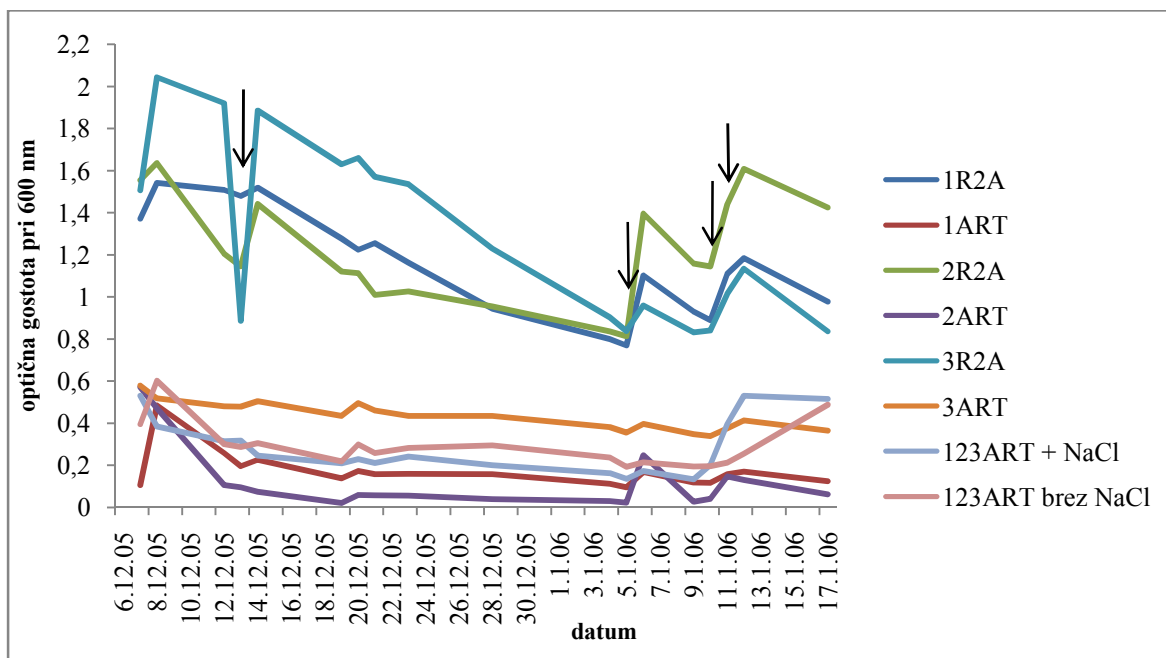
Po 18 dneh (6. decembra 2005) smo koncentrirane vzorce bogatitev solinskih organizmov prenesli v sveža gojišča z enako sestavo in volumnom. Prvotne bogatitve smo nehali stresati, vendar smo nekaj dni še merili OG. Dan po prenosu smo začeli meriti OG tudi v bogatitvah s svežimi gojišči, ki so bila na stresalniku. Meritve smo tu izvajali 6 tednov (do 17. januarja 2006) (Slika 7).

Tudi v teh bogatitvah so bile najvišje vrednosti OG v prvih dneh merjenja. Najvišje vrednosti so bile tu višje (Slika 7) od najvišjih vrednosti OG v bogatitvah z vcepljenimi neprilagojenimi solinskimi organizmi, ki prej niso bili v gojiščih (Slika 6).

Odzivi na dodatek svežega gojišča so bili tudi v tem primeru bolj opazni v gojiščih R2A, kjer so bile tudi vrednosti izmerjene OG izrazito višje.

V gojiščih ART se je združba v 2 ART burneje odzvala na drugi in tretji dodatek svežega gojišča, v ostalih bogatitvah s to sestavo gojišča pa se vrednosti OG niso bistveno spreminjale. Zanimiv je končni dvig vrednosti OG v gojiščih ART s skupnimi vcepki, 123 ART +NaCl in 123 ART brez NaCl (Slika 7).

V bogatitvi 3 R2A je bila 13. decembra vrednost OG zelo nizka, v primerjavi s predhodno in naslednjo meritvijo (Slika 7). V tem vzorcu smo isti dan opazili pojav kosmičenja in usedanja kosmov na dno merilne kivete.



Slika 7: spreminjanje optične gostote bogatitev s predhodno obogatenimi solinskimi organizmi. Puščice označujejo dodatek 100 ml svežega gojišča v vsa gojišča. Oznake gojišč in vzorcev so enake kot pri prejšnjem grafu (slika 6).

Pri merjenju OG smo ugotovili, da so združbe solinskih organizmov postale bolj stabilne kot so bile na začetku bogatenja, že po dveh tednih v gojišču. Takrat po dodatku svežih hranil nismo več zaznali tako velikega skoka in kasnejšega padca OG. Nihanje števila organizmov torej ni bilo več tako izrazito kot ob prvem dodatku svežega gojišča.

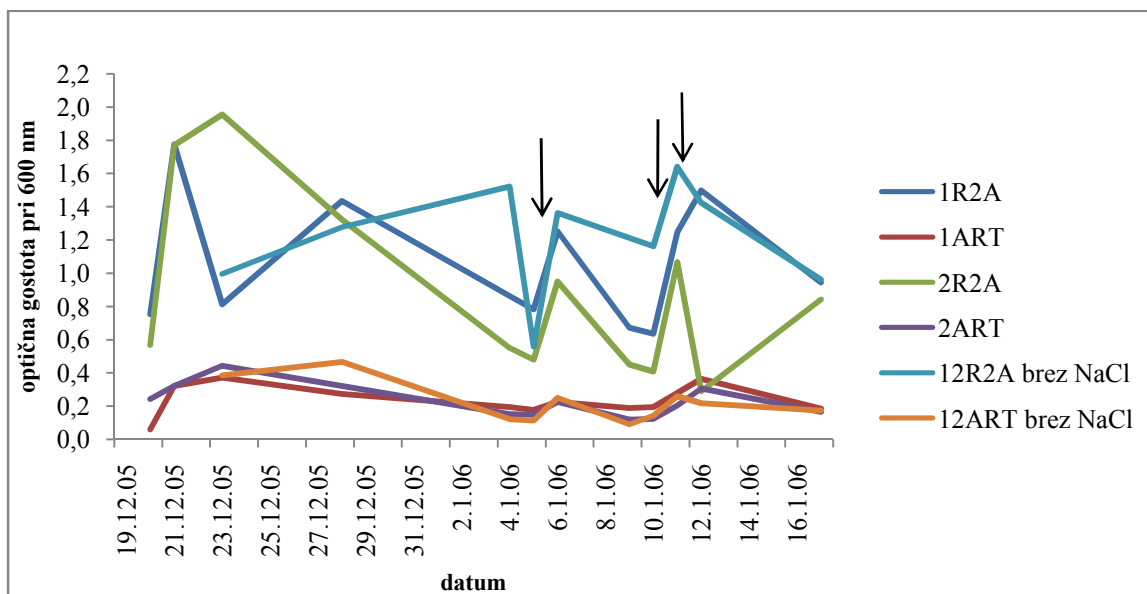
4.1.1.2 BOGATITEV MIKROORGANIZMOV AKTIVNEGA BLATA

Da bi preverili odziv mikrobne združbe aktivnega blata na gojenje v gojiščih, ki ustrezajo slani in neslani odpadni vodi, smo v gojišča vcepili tudi organizme aktivnega blata.

Z izjemo bogatitve skupnih vzorcev v gojišču R2A brez NaCl so bile pri vseh bogatitvah najvišje izmerjene vrednosti OG v prvih dneh po vcepitvi. Bogatitve v gojiščih R2A so imele, z izjemo ene meritve (2 R2A, 12. januar), višje vrednosti OG kot bogatitve v gojiščih ART (Slika 8).

Na prvo in drugo dodajanje svežega gojišča so se združbe v vseh gojiščih odzvale s povišano rastjo, medtem ko je bil odziv na tretje dodajanje gojišča različen. V polovici bogatitev je OG narasla, v drugi polovici pa padla. Pri nadaljnjih meritvah je v vseh

bogatitvah OG upadla, razen v 2 R2A, kjer je po izrazitem padcu na koncu OG spet narasla (Slika 8).



Slika 8: spreminjanje optične gostote v bogatitvah z vcepljenim aktivnim blatom z biološke čistilne naprave. Puščice prikazujejo dodatek po 100 ml svežega gojišča. Številki 1 in 2 pomenita vzorca aktivnega blata, ki sta bila vcepljena v različna gojišča. Uporabljeni sta bili gojišči R2A in ART z NaCl (1,5 odstotka) in brez NaCl).

V bogatitvah z organizmi aktivnega blata je bilo nihanje gostote organizmov skozi ves čas gojenja veliko. Združbe se niso stabilizirale glede števila organizmov, saj so velikim porastom sledili izraziti upadi gostote organizmov v gojišču.

4.1.2 Molekularna analiza združb v bogatitvah

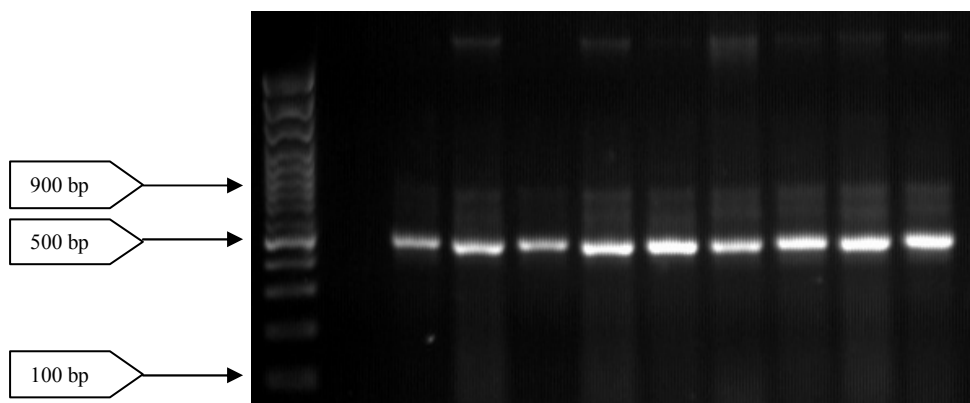
Za določitev vrstne pestrosti organizmov in sorodnosti v obogatenih združbah, smo izolirali celokupno DNA. V prvi stopnji smo pomnožili značilne odseke DNA za bakterije in glive. Tako smo pridobili podatke o pestrosti in spreminjanju združb bakterij in gliv. V naslednji stopnji smo z določanjem nukleotidnega zaporedja fragmentov DNA, ki smo jih s TTGE ločili na gelu, poiskali najbližje sorodnike izbranih bakterij in gliv v združbah.

Na vseh slikah TTGE profilov združb je dodana lestvica λ /PstI (Fermentas, Vilnius, Litva) v neoznačenih stolpcih, ki so bili vedno vsaj na levi in desni strani gela. Obkrožene lise na slikah pomenijo, da so ti fragmenti zanimivi za nadaljnjo analizo ker ta DNA pripada organizmom, ki so se uspešno prilagodili na spremenjene razmere.

4.1.2.1 ANALIZA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB

a) Pomnoževanje dela 16S rDNA z verižno reakcijo s polimerazo Taq (PCR)

Z oligonukleotidnima začetnikoma U968-GC in L1401 smo z metodo PCR pomnožili predel od V6 do V8 gena za 16S rRNA iz celokupne DNA izbranih vzorcev.



Slika 9: primer na UV-svetlobi slikanega agaroznega gela (po končani elektroforezi) z nanesenimi pomnoženimi fragmenti DNA, ki kodirajo del bakterijske 16S rRNA.

Na levi strani je DNA lestvica (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas inc., Burlington, Kanada), na kateri najmočnejša lisa kaže fragment z velikostjo 500 baznih parov. Fragmenti proti vrhu so vedno večji, proti dnu pa vedno manjši. V naslednjem stolpcu proti desni je nanescena kontrolna reakcijska mešanica, nato pa sledijo naneseni pomnoženi fragmenti bakterijske DNA iz vzorcev. Za obarvanje DNA je bil v gel dodan etidijev bromid.

Zgornja slika je nastala po uspešni pomnožitvi zelene regije bakterijske DNA v vzorcih.

b) TTGE (gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom) za analizo bakterijskih združb v bogatitvah

Na poliakrilamidni gel smo nanašali pomnožene dele genov za bakterijsko 16S rRNA in tako naredili profile solinskih bakterijskih združb, ki smo jih gojili v laboratoriju v gojiščih R2A in ART z 1,5-odstotno slanostjo. Na enak način smo postopali z vzorci aktivnega blata, ki smo jih obogatili v gojiščih R2A in ART z 1,5 odstotka NaCl. Na gele pa smo nanесли tudi izhodne vzorce vode oziroma blata, iz katerih se je kasneje razvila končna, obogatena združba.

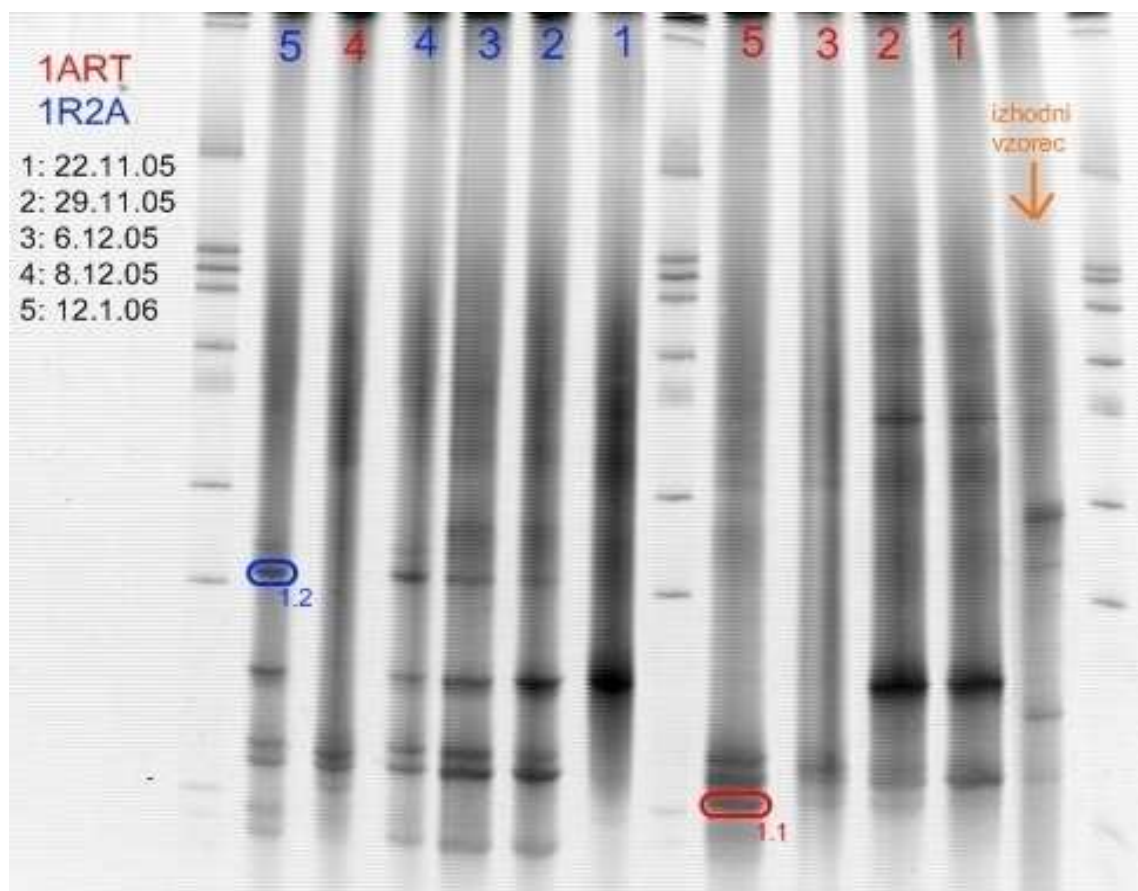
4.1.2.1.1 TTGE profili in filogenetka uvrstitev solinskih bakterij v bogatitvah

Prvi solinski vzorec: v profilu izhodnega vzorca je bilo vidnih nekaj lis, od katerih po intenzivnosti nobena močno ne izstopa.

Že v prvem vzorčenju bogatitve 1 ART je bila vidna močna okrepitev ene od lis izhodnega vzorca, ki je bila tam še zelo slabo vidna. Lisa na enaki razdalji in s podobno intenzivnostjo se je pojavila še pri naslednjem vzorčenju 1 ART, kasneje pa izginila. Okrepitev druge, v izhodnem vzorcu bolj vidne lise, je bila manj intenzivna, vendar se je lisa na tej lokaciji ohranila tudi kasneje. Nad in pod njo sta se pojavili še dve lisi, spodnja se kasneje bolje izrazi kot zgornja (Slika 10), zato sklepamo, da pripada ta DNA organizmom, ki so bili na začetku slabo zastopani v združbi, v zadnjih vzorčenjih pa so je njihova prisotnost okrepila. To liso (1.1) smo si izbrali za določitev nukleotidnega zaporedja DNA.

Preobrat v strukturi združbe se je zgodil pred tretjim vzorčenjem, v času dveh tednov. Zelo očitno je izginilo nekaj prej dobro vidnih lis, pojavile pa so se nove, ki so ostale prisotne do konca (Slika 10).

V profilu bogatitve 1 R2A se je pri prvem vzorčenju pojavila zelo intenzivno izražena lisa, ki je kasneje rahlo izgubila na intenzivnosti, vendar se je njena prisotnost ohranila do konca. Nekaj dodatnih, dobro vidnih lis se je pojavilo nižje že v drugem vzorčenju in so se ohranile v podobni intenzivnosti, ali rahlo zbledele do končnih vzorčenj. Višje od lise, ki je v prvem vzorčenju najbolj vidna, se je v drugem vzorčenju pojavila lisa, ki tu še ni zelo intenzivna, v profilih kasnejših vzorčenj pa se vidno krepi (Slika 10). Odločili smo se za določitev nukleotidnega zaporedja DNA v tej lisi (1.2). Bistvenih sprememb v strukturi združbe od drugega vzorčenja dalje ni bilo opaziti, spremenila se je le intenzivnost lis. Preobrat v vrstni sestavi se je torej zgodil na začetku, v času med prvim in drugim vzorčenjem, torej v času enega tedna.



Slika 10: analiza solinskih bakterijskih 16S rDNA fragmentov prvega solinskega vzorca z metodo TTGE. Bakterije smo gojili v gojiščih R2A in ART z 1,5 odstotka NaCl. Številke na vrhu stolpcev označujejo kdaj je bil odvzet vzorec gojišča z vcepkom in vrstni red vzorčenja, barva pa označuje gojišče. Označen je tudi profil izhodnega prvega vzorca iz solin. Obkrožene lise in številke ob njih označujejo lise, za katere smo določali nukleotidno zaporedje.

Filogenetska uvrstitev izbranih solinskih bakterij prvega solinskega vzorca v bogatitvah:

V gojišču ART se je, glede na TTGE profil in kasnejšo določitev nukleotidnega zaporedja, tekom vzorčenja najbolj okrepila lisa 1.1, katere DNA kaže pripadnost bakterijskemu rodu *Marinobacter* (Tabela 4).

V gojišču R2A pa smo opazili krepitev lise 1.2, katere fragment 16S rDNA pripada bakterijam iz sorodstva rodu *Providencia* (Tabela 4).

Tabela 4: filogenetska uvrstitev izbranih bakterij prvega solinskega vzorca, glede na nukleotidna zaporedja .

Oznaka lise	Sorodni mikroorganizmi	Višja taksonomska uvrstitev	Stopnja sorodnosti
1.1 Dolžina nukl.zap.: 426 bp	<i>Marinobacter</i> sp. AJ302707	ph. Proteobacteria	0,995
	<i>Marinobacter</i> sp. AJ000647	cl. Gammaproteobacteria	0,995
	<i>Marinobacter</i> sp. AB166957	o. Alteromonadales	0,995
	<i>Marinobacter</i> sp. AB166972	f. Incertae sedis	0,995
	<i>Marinobacter</i> sp. AB166980	g. Marinobacter	0,995
1.2 Dolžina nukl.zap.: 414 bp	<i>Providencia stuartii</i> AY803746		0,993
	Bakterija iz družine Enterobacteriaceae EF151985	ph. Proteobacteria	0,993
	<i>Providencia</i> sp. EF061136	cl. Gammaproteobacteria	
	<i>Providencia</i> sp. AM040495	o. Enterobacteriales	0,990
	<i>Providencia</i> sp. EU195873	f. Enterobacteriaceae	0,990
			0,988

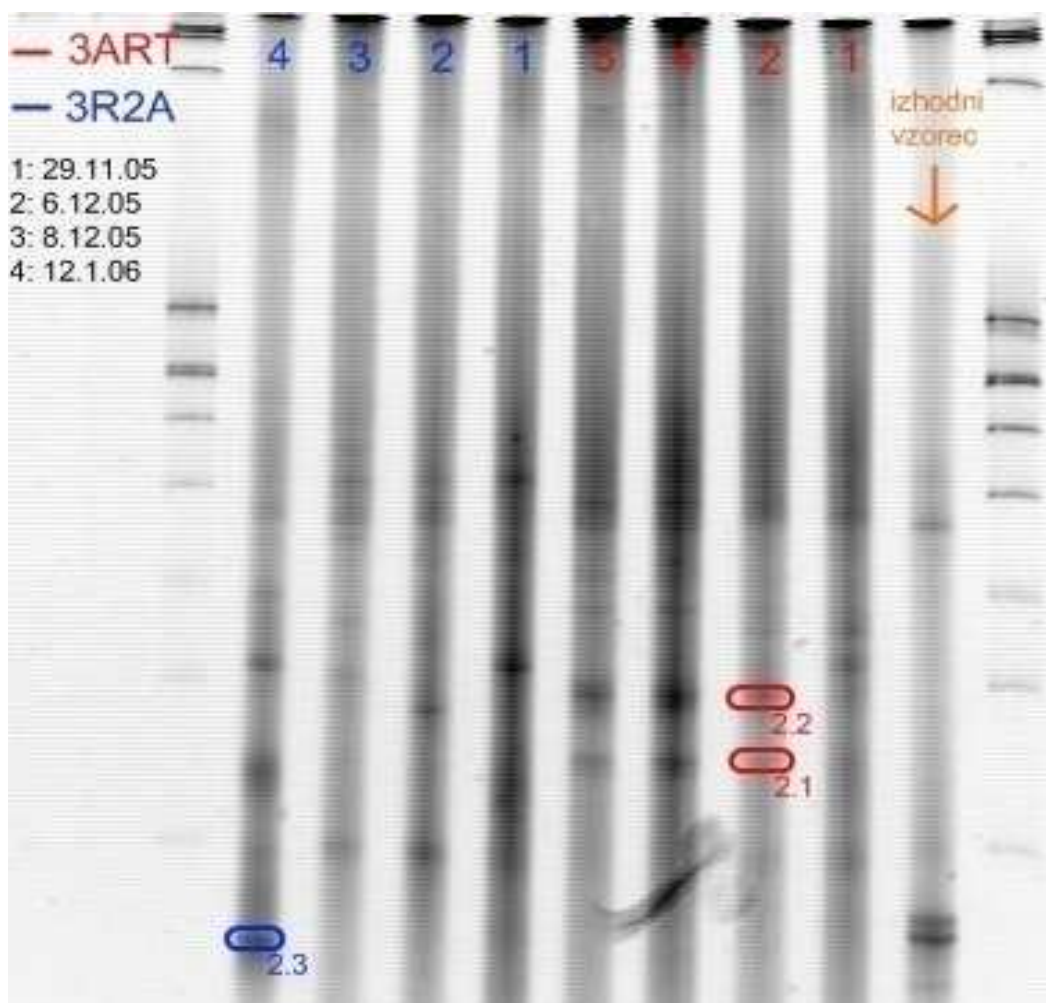
Za drugi vzorec iz solin, ki smo ga tudi vcepili v gojišča v laboratoriju, po TTGE nismo dobili zadovoljivih rezultatov, ki bi omogočali natančno analizo, zato ga v le-to nismo vključili.

Tretji solinski vzorec: profil izhodnega tretjega solinskega vzorca kaže malo lis, od katerih sta dve močnejše izraženi (Slika 11).

V prvem vzorčenju iz bogatitve 3 ART je bilo mogoče opaziti nekaj slabo izraženih lis.

V kasnejših vzorčenjih je bilo v profilu združbe v gojišču ART vidnih več lis. Za nadaljnje analize sorodstva organizmov, ki naj bi bili predstavniki na slano odpadno vodo prilagojenih bakterij, smo si izbrali lisi 2.1 in 2.2, ki sta se v profilu združbe okrepili z vsakim vzorčenjem (Slika 11). Ker sta se ti dve lisi, ki glede na TTGE profil predstavljata pomembne organizme v združbi, pojavili v profilu drugega vzorčenja, bi lahko sklepali, da se je preobrat v sestavi združbe zgodil med prvim in drugim vzorčenjem, torej v času enega tedna.

V profilu združbe iz bogatitve 3 R2A smo si za uvrstitev v sorodstvo izbrali DNA lise 2.3, ki se je dovolj močno izrazila šele v zadnjem vzorčenju, zato bi lahko čas med tretjim in zadnjim vzorčenjem, torej po dveh do treh tednih gojenja, vzeli za prelomnico v vrstni sestavi združbe v tej bogatitvi.



Slika 11: profili razporeditve solinskih bakterijskih 16S rDNA fragmentov združb tretjega solinskega vzorca z metodo TTGE.

Vzorec je bil vcepljen v gojišči R2A in ART z 1,5 odstotka NaCl. Številke na vrhu stolpcev označujejo, kdaj je bil odvzet vzorec gojišča z vcepkom, barva pa označuje vrsto gojišča. Označen je stolpec s profilom tretjega izhodnega solinskega vzorca. Obkrožene lise in številke ob njih kažejo, katerim lisam DNA smo določali nukleotidno zaporedje.

Filogenetska uvrstitev izbranih solinskih bakterij tretjega solinskega vzorca v bogatitvah:

Lisa DNA organizma iz bogatitve 3 ART, ki je na gelu potovala dlje (2.1), je bila po nukleotidnem zaporedju sorodna bakterijskemu rodu *Halomonas*. DNA lise 2.2, ki se je ustavila v gelu pri nižji temperaturi, je pokazala pripadnost bakterijam rodu *Idiomarina* (Tabela 5).

V gojišču R2A z vcepljenim tretjim solinskim vzorcem smo izbrano liso 2.3 po določitvi nukleotidnega zaporedja uvrstili v sorodstvo z bakterijskega rodu *Idiomarina* (Tabela 5).

Tabela 5: filogenetska uvrstitev izbranih bakterij tretjega solinskega vzorca, glede na nukleotidna zaporedja.

Oznaka lise	Sorodni mikroorganizmi	Višja taksonomska uvrstitev	Stopnja sorodnosti
2.1 Dolžina nukl.zap.: 208 bp	<i>Halomonas</i> sp. AB305227	ph. Proteobacteria	0,985
	<i>Halomonas</i> sp. AF139994	cl. Gammaproteobacteria	0,985
	<i>Halomonas</i> sp. DQ279849	o. Oceanospirillales	0,985
	<i>Halomonas</i> sp. DQ531953	f. Halomonadaceae	0,985
	<i>Halomonas</i> sp. AF139993	g. Halomonas	0,981
2.2 Dolžina nukl.zap.: 324 bp	<i>Idiomarina</i> sp. AB166901	ph. Proteobacteria	0,997
	<i>Idiomarina</i> sp. AB166910	cl. Gammaproteobacteria	0,997
	<i>Idiomarina</i> sp. AB166930	o. Alteromonadales	0,997
	<i>Idiomarina</i> sp. AB166939	f. Idiomarinaceae	0,997
	<i>Idiomarina</i> sp. AB166940	g. Idiomarina	0,997
2.3 Dolžina nukl.zap.: 363 bp.	<i>Idiomarina</i> sp. AB166901	ph. Proteobacteria	0,994
	<i>Idiomarina</i> sp. AB166910	cl. Gammaproteobacteria	0,994
	<i>Idiomarina loihiensis</i> AY092077	o. Alteromonadales	0,994
	<i>Idiomarina</i> sp. AB166930	f. Idiomarinaceae	0,989
	Negojljiva bakterija	g. Idiomarina	0,992

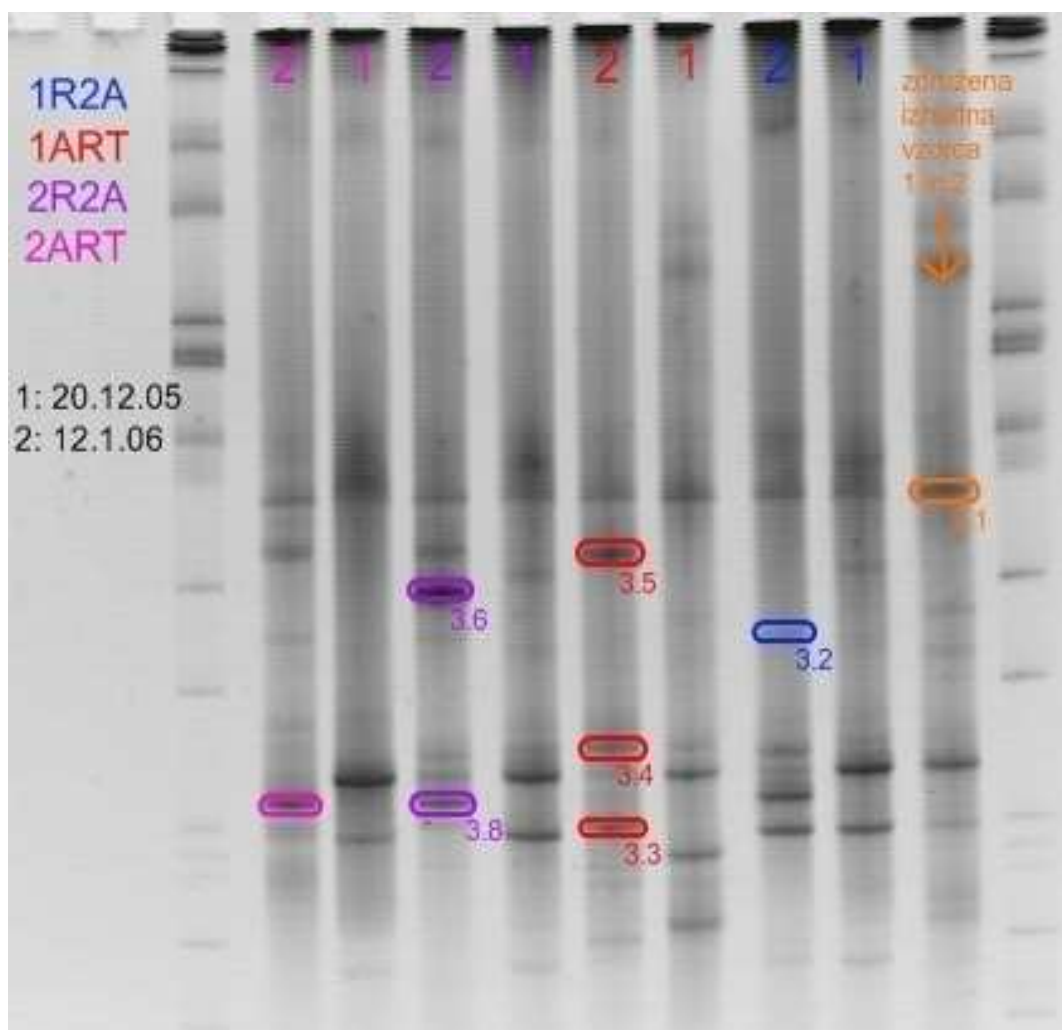
4.1.2.1.2 TTGE profili in filogenetska uvrstitev bakterij združbe aktivnega blata v bogatitvah

Izhodna vzorca aktivnega blata smo združili. TTGE profil bakterijske združbe je kazal veliko pestrost organizmov. Za ugotavljanje sorodstva je bil najbolj zanimiv organizem, ki mu pripada DNA lise 3.1, ker se je pojavil v vseh bogatitvah, ne glede na sestavo gojišča in čas bogatenja (Slika 12). Žal je bil rezultat določanja nukleotidnega zaporedja premalo kvaliteten za verodostojno uvrstitev v filogenetsko sorodstvo.

Profili bakterijskih združb iz vseh bogatitev organizmov aktivnega blata se v drugem vzorčenju, v primerjavi s prvim, zelo spremenijo. Večina najbolj izraženih lis iz prvih vzorčenj, je v profilih drugih vzorčenj zbledela. Pojavile pa so se intenzivno izražene lise na drugih lokacijah (Slika 12).

Profili prvih vzorčenj so si bili med seboj podobni, podobni pa so tudi profilu združbe združenih izhodnih vzorcev. Rahlo je odstopal le profil bogatitve 1 ART (Slika 12).

Profili drugih vzorčenj si med seboj niso bili več izrazito podobni, kar pomeni, da je v vsaki bogatitvi šel razvoj združbe svojo pot. Vrstna struktura v vseh bogatitvah se je spremenila nekje med prvim in drugim vzorčenjem, torej v roku treh tednov. Lise, ki so se na novo pojavile ali tiste, ki si se zelo okrepile v drugem vzorčenju, smo izbrali za ekstrakcijo DNA in določanje nukleotidnega zaporedja.



Slika 12: TTGE analiza bakterijskih 16S rDNA fragmentov združb aktivnega blata.

Dva vzorca aktivnega blata smo vcepili v gojišči R2A in ART z 1,5-odstotim NaCl. Številke na vrhu označujejo zaporedje odvzema gojišča z vcepkom, barva pa vrsto gojišča. V prvem stolpcu od desne proti levi (če izvajamo lestvico) je TTGE profil združenih izhodnih vzorcev 1 in 2. Iz obkroženih in oštevilčenih lis smo določali nukleotidno zaporedje DNA.

Filogenetska uvrstitev izbranih bakterij združbe aktivnega blata v bogatitvah:

Določitev filogenetske pripadnosti organizmov, katerim so pripadale lise drugega vzorčenja iz bogatitev v gojiščih R2A, je pokazala sorodnost rodovom *Aeromonas* (lisa 3.2 iz 1 R2A), *Vibrio* (lisa 3.6 iz 2 R2A) in *Shewanella* (lisa 3.8 iz 2 R2A) (Tabela 6).

Združba prvega vzorca aktivnega blata v gojišču ART je ob drugem vzorčenju sestavljena iz vsaj treh različnih bakterijskih rodov, in sicer *Aeromonas* (3.3), *Pseudomonas* (3.4) in *Alishewanella* (3.5) (Tabela 6).

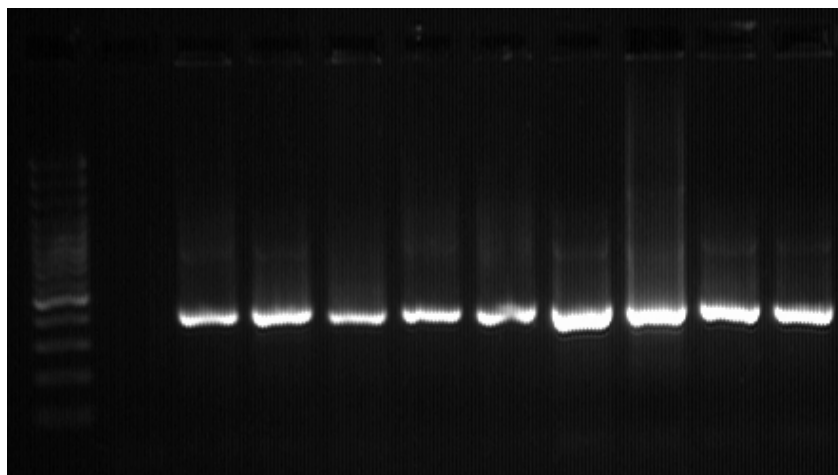
Tabela 6: filogenetska uvrstitev izbranih bakterij združbe aktivnega blata, glede na nukleotidna zaporedja.

Oznaka lise	Sorodniki	Višja taksonomska uvrstitev	Stopnja sorodnosti
3.2 Dolžina nukl.zap.: 375 bp	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>Dhakensis</i> AJ508765	ph. Proteobacteria	0,984
	bacterium G3 GreenLake AY345394	cl. Gammaproteobacteria	0,984
	<i>Aeromonas enteropelogenes</i> X60415	o. Aeromonadales	0,984
	<i>Aeromonas punctata</i> subsp. <i>Punctata</i> X60408	f. Aeromonadaceae	0,984
	<i>Aeromonas punctata</i> subsp. <i>Punctata</i> X74674	g. Aeromonas	0,979
3.3 Dolžina nukl.zap.: 303 bp	negojljiv <i>Aeromonas</i> sp. EF679186	ph. Proteobacteria	0,977
	negojljiva bakterija DQ814272	cl. Gammaproteobacteria	0,974
	negojljiva bakterija DQ816671	o. Aeromonadales	0,974
	negojljiv <i>Aeromonas</i> sp. EF679182	f. Aeromonadaceae	0,974
	negojljiva bakterija DQ814806	g. Aeromonas	0,967
3.4 Dolžina nukl.zap.: 357 bp	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AJ270455	ph. Proteobacteria	0,994
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AJ270457	cl. Gammaproteobacteria	0,994
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AJ270456	o. Pseudomonadales	0,994
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> AJ270458	f. Pseudomonadaceae	0,994
	negojljiva bakterija AY770964	g. Pseudomonas	0,994
3.5 Dolžina nukl.zap.: 221 bp	gamma proteobacterium AB010842	ph. Proteobacteria	1,000
	negojljiva bakterija AF290480	cl. Gammaproteobacteria	1,000
	negojljiva bakterija AF371858	o. Alteromonadales	1,000
	<i>Alishewanella fetalis</i> AF144407	f. Incertae sedis	1,000
	negojljiva bakterija AF371859	g. Alishewanella	1,000
3.6 Dolžina nukl.zap.: 423 bp	Neidentificirana bakterija AF293974	ph. Proteobacteria	0,988
	<i>Vibrio pomeroyi</i> AB257324	cl. Gammaproteobacteria	0,988
	<i>Vibrio pomeroyi</i> AB257329	o. Vibrionales	0,988
	<i>Vibrio crassostreae</i> EF094887	f. Vibrionaceae	0,988
	<i>Vibrio</i> sp. EF187006	g. Vibrio	0,988
3.8 Dolžina nukl.zap.: 379 bp	Antarctična bakterija AJ440976	ph. Proteobacteria	0,995
	<i>Shewanella</i> sp. AY573039	cl. Gammaproteobacteria	0,995
	<i>Shewanella baltica</i> AY771739	o. Alteromonadales	0,995
	<i>Shewanella</i> sp. CP000503	f. Shewanellaceae	0,995
	<i>Shewanella baltica</i> CP000563	g. Shewanella	0,995

4.1.2.2 ANALIZA GLIVNIH ZDRUŽB

a) Pomnoževanje dela 18S rDNA z verižno reakcijo s polimerazo Taq (PCR)

Za pomnoževanje dela gena, ki določa 18S rRNA pri glivah, smo uporabili metodo polvgnezdeno PCR. Za pridobitev zelenega fragmenta sta bili za vsak vzorec potrebni 2 zaporedni reakciji PCR. V prvi reakciji smo uporabili OZ EF4 in Fung5 in s tem pomnožili regijo rDNA v velikosti 550-600 bp, v drugi reakciji pa smo pomnožili 400 bp velik del, vgnezen znotraj s prvo reakcijo pomnožene regije, in sicer z OZ EF4 in NS2-GC.



Slika 13: pod UV-svetlobo slikan agarozni gel po elektroforezi z nanesenimi pomnoženimi glivnimi 18S rDNA fragmenti.

Na levi strani je DNA lestvica (GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas inc., Burlington, Kanada), najmočnejša lisa na njej kaže fragment v velikosti 500 baznih parov. Velikosti fragmentov so označene na sliki agaroznega gela s pomnožki bakterijskih 16S rDNA. V naslednji stolpec proti desni je bila nanesena kontrolna reakcijska mešanica, nato pa sledijo nanosi pomnoženih fragmentov 18S rDNA. Za barvanje DNA je bil v gel dodan etidijev bromid.

b) TTGE (gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom) za analizo glivnih združb bogatitev

Na poliakrilamidni gel smo nanесли s polvgnezdeno PCR reakcijo pomnožene dele gena, ki določa glivno 18S rRNA. Profilirali smo solinske glivne združbe, ki smo jih gojili v gojiščih R2A in ART z 1,5 odstotka NaCl in brez NaCl, ter glivne združbe aktivnega blata, ki smo jih bogatili v slanih gojiščih R2A in ART.

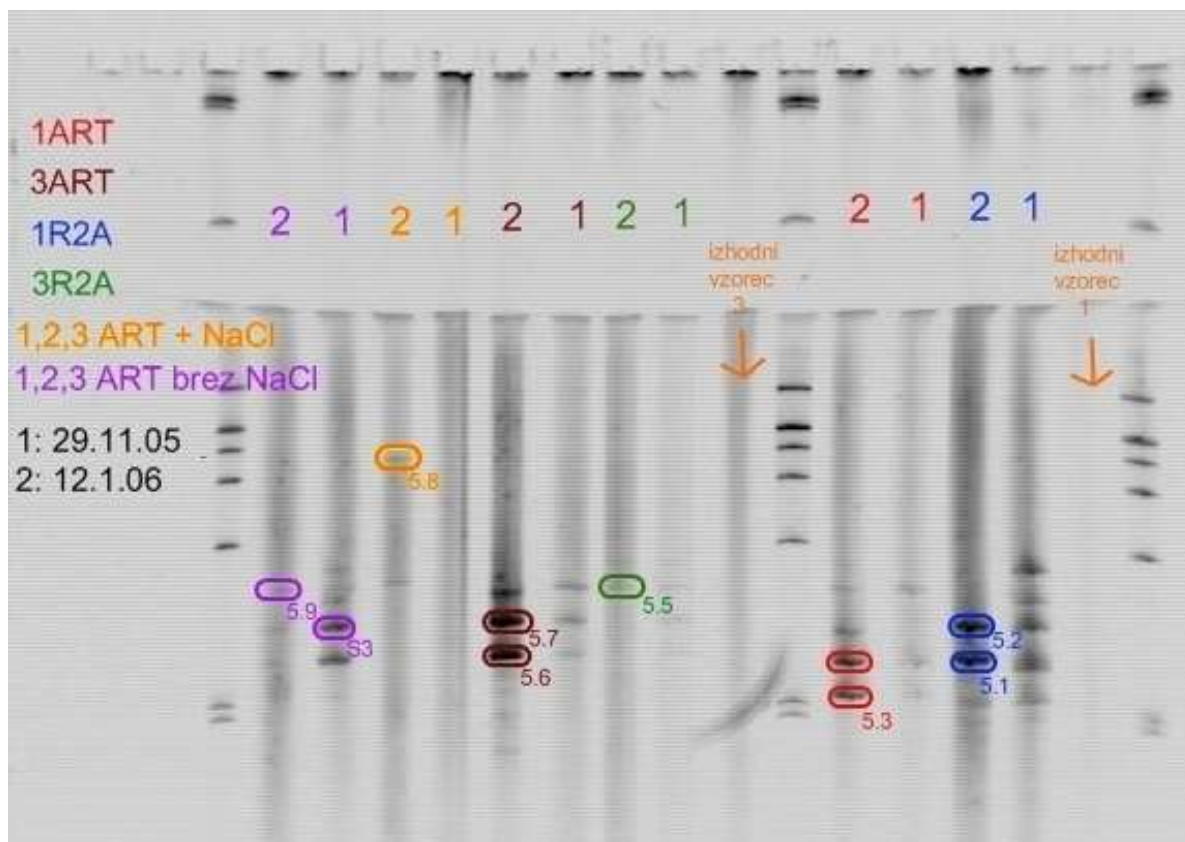
4.1.2.2.1 TTGE profili in filogenetska uvrstitev solinskih glivnih združb v bogatitvah

V prvem in tretjem izhodnem vzorcu iz solin ni bilo mogoče opaziti jasno izraženih lis.

Že v prvem vzorčenju iz bogatitev (z izjemo 1,2,3 ART + NaCl) je bilo prisotnih veliko lis, kar kaže na pestro združbo. Ob drugem vzorčenju smo v večini bogatitev opazili jasneje izražene pare lis, ponekod pa tudi posamezne lise, ki so bile prisotne že v prvem vzorčenju, vendar so bile manj intenzivno izražene (Slika 14).

V gojišču brez soli (1,2,3 ART brez NaCl) je razvoj združbe, na osnovi TTGE profila, nekako obraten, saj se je v prvem vzorčenju izoblikovala združba s parom bolj izraženih lis, nato pa sta ti dve lisi zbledeli (Slika 14).

O zelo očitnih spremembah v vrstni sestavi združb pri solinskih glivnih vcepkih ne moremo govoriti, saj so se v večini primerov le okrepile ali zbledele že v profilu prejšnjega vzorčenja obstoječe lise (Slika 14).



Slika 14: rezultat TTGE analize 18S rDNA fragmentov solinskih glivnih združb iz bogatitev v gojiščih R2A in ART.

Številke na vrhu označujejo vrstni red odvzema bogatitve, po barvi pa se ločijo vrste gojišč. Gojišči, označeni z 1R2A in 1ART sta imeli vcepljen izhodni solinski vzorec 1, gojišči 3R2A in 3ART pa izhodni solinski vzorec 3. Gojišči 1,2,3 + NaCl in 1,2,3 brez NaCl sta imeli vcepke vseh treh solinskih izhodnih vzorcev. Obkrožene in oštevilčene so tiste lise, iz katerih smo določali nukleotidno zaporedje DNA.

Filogenetska uvrstitev izbranih gliv prvega in tretjega solinskega vzorca v bogatitvah:

Vsi pripadniki gliv iz bogatitev s solinskimi vcepki so se izkazali za pripadnike zaprtotrosovnic (Ascomycota), z izjemo lise 5.8. Najbolj pogost rod, v katerega sorodstvo pripadajo organizmi iz teh bogatitev, je bil *Saccharomyces*. Temu rodu sorodni so bili organizmi, katerih DNA je končala v lisah 5.2 (1 R2A), 5.6 in 5.7 (3ART) ter S3 (123 ART brez NaCl) (Tabela 7).

V rod *Candida*, ki spada v bližnje sorodstvo rodu *Saccharomyces*, smo po nukleotidnem zaporedju uvrstili organizem, ki mu pripada DNA lise 5.3 (1 ART) (Tabela 7).

Lisi 5.1 (1 R2A) in 5.5 (3 R2A) sta pokazali sorodnost na nivoju razreda Dothideomycetes (Tabela 7). Kvaliteta nukleotidnega zaporedja DNA iz lise 5.1 je bila slaba (veliko neznanih nukleotidov), zato je bila tudi zanesljiva uvrstitev v ožje sorodstvo nemogoča.

Organizem, ki mu je pripadala lisa 5.8, je bil uvrščen med prostotrosovnic (Basidiomycota), po nukleotidnem zaporedju smo ga uvrstili v red Polyporales (luknjičarji) (Tabela 7).

Tabela 7: filogenetska uvrstitev izbranih gliv v solinskih vzorcih, glede na nukleotidna zaporedja.

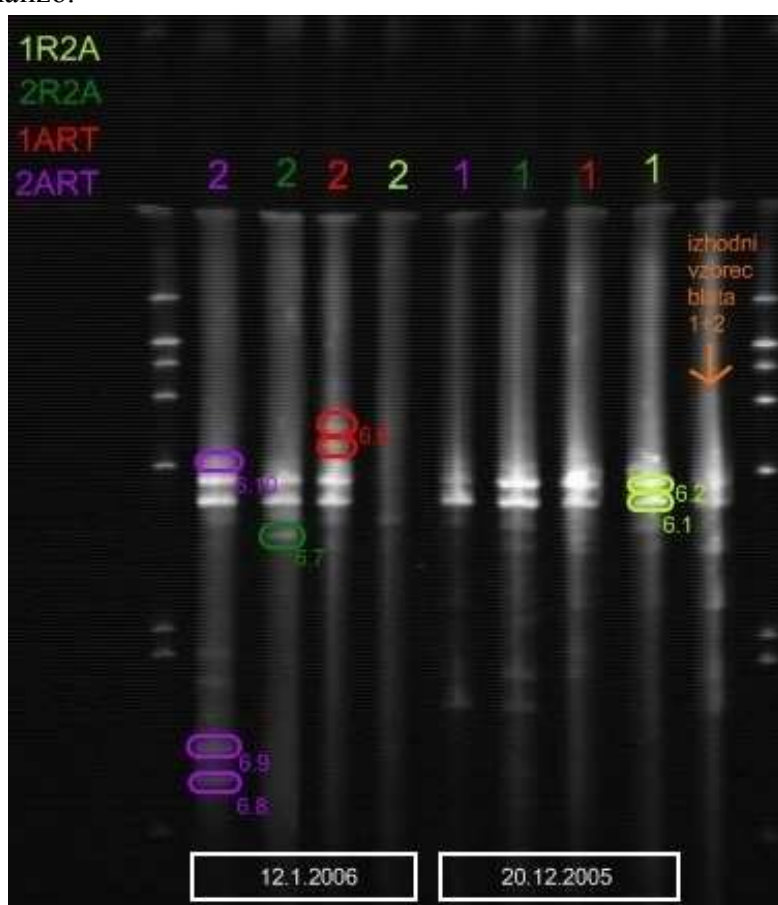
Oznaka lise	Sorodniki	Višja taksonomska uvrstitev	Stopnja sorodnosti
5.1 Dolžina nukl.zap.: 243 bp	AY856935 <i>Helicoma isiola</i>		0,938
	EF204510 <i>Botryosphaeria viticola</i>	Ascomycota	0,934
	EU167600 <i>Didymella rabiei</i>	Pezizomycotina	0,934
	EU167573 <i>Didymella bryoniae</i>	Dothideomycetes	0,934
	EU167566 <i>Didymella fabae</i>		0,934
5.2 Dolžina nukl.zap.: 379 bp	EU011664 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	0,976
	EF212442 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycotina	0,976
	BR000309 <i>Saccharomyces paradoxus</i>	Saccharomycetes	0,976
	EF153845 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	0,976
	EF153844 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetaceae	0,976
5.3 Dolžina nukl.zap.: 267 bp	EU348785 <i>Candida tropicalis</i>	Ascomycota	1,000
	EF141326 <i>Candida parapsilosis</i>	Saccharomycotina	1,000
	EF120593 <i>Candida neerlandica</i>	Saccharomycetes	1,000
	EF120585 <i>Candida</i> sp.	Saccharomycetales	1,000
	EF120584 <i>Candida</i> sp.		1,000
5.5 Dolžina nukl.zap.: 331 bp	EU167600 <i>Didymella rabiei</i>		0,982
	EU167573 <i>Didymella bryoniae</i>	Ascomycota	0,982
	EU167575 <i>Phoma medicaginis</i>	Pezizomycotina	0,982
	AY642520 <i>Coniothyrium insitivum</i>	Dothideomycetes	0,982
	AY642518 <i>Microsphaeropsis olivacea</i>		0,982
5.6 Dolžina nukl.zap.: 367 bp	EU011664 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	0,995
	EF212442 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycotina	0,995
	BR000309 <i>Saccharomyces paradoxus</i>	Saccharomycetes	0,995
	EF153845 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	0,995
	EF153844 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetaceae	0,995
5.7 Dolžina nukl.zap.: 378 bp	EU011664 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	0,995
	EF212442 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycotina	0,995
	BR000309 <i>Saccharomyces paradoxus</i>	Saccharomycetes	0,995
	EF153845 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	0,995
	EF153844 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetaceae	0,995
5.8 Dolžina nukl.zap.: 278 bp	AY336771 <i>Corioloopsis polyzona</i>	Basidiomycota	1,000
	AY336760 <i>Hexagonia hirta</i>	Agaricomycotina	1,000
	AY336758 <i>Hexagonia pobeguini</i>	Agaricomycetes	1,000
	AY336757 <i>Megasporoporia cavernulosa</i>	Agaromycetes incertae sedis	1,000
	AY705970 <i>Pycnoporus</i> sp.	Polyporales	1,000
5.9 Dolžina nukl.zap.: 380 bp	AY779277 <i>Acremonium</i> sp.		0,995
	AY392130 <i>Acremonium</i> sp.	Ascomycota	0,995
	AF049148 <i>Stanjemonium fuscescens</i>	mitosporne Ascomycota	0,992
	AF049152 <i>Stanjemonium ochroroseum</i>		0,992
	AF049151 <i>Stanjemonium grisellum</i>		0,992
S3 Dolžina nukl.zap.: 379 bp	EU011664 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	0,995
	EF212442 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycotina	0,995
	BR000309 <i>Saccharomyces paradoxus</i>	Saccharomycetes	0,995
	EF153845 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	0,995
	EF153844 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetaceae	0,995

4.1.2.2.2 TTGE profili in filogenetska pripadnost gliv združbe aktivnega blata v bogatitvah

V vseh bogatitvah, z izjemo drugega vzorčenja iz bogatitve 1 R2A, kamor je bila vcepljena združba aktivnega blata s koprskе čistilne naprave, sta se pojavili dve lisi (6.1 in 6.2), ki sta bili najbolj izraziti in sta tudi na enaki razdalji v gelu. Ti dve lisi sta bili vidni že v združenem izhodnem vzorcu, vendar sta kasneje, v bogatitvah postali bolj jasno izraženi (Slika 15).

V izhodnem vzorcu in prvih vzorčenjih iz bogatitev je bilo vidnih več lis, kot v profilih združb iz drugih vzorčenj (Slika 15).

Lise, ki so v drugih vzorčenjih enako ali bolj izrazite, kot v prvih vzorčenjih, smo določili za nadaljnjo analizo.



Slika 15: TTGE profili združb gliv (18S rDNA) iz aktivnega blata, ki smo jih gojili v laboratoriju. V desnem stolpcu je profil združenih obeh izhodnih vzorcev. Številke na vrhu označujejo zaporedje vzorčenja (datuma sta spodaj), barva pa gojišče. Vsa gojišča so imela dodanega 1,5 odstotka NaCl. Obkrožene in oštevilčene so tiste lise, iz katerih smo določali nukleotidno zaporedje.

Filogenetska uvrstitev izbranih gliv iz bogatitev organizmov aktivnega blata:

V bogatitvah združbe aktivnega blata je v lisah 6.8 in 6.9 DNA predstavnikov glivnega debla Neocallimastigomycota, kamor spadajo primitivnejši organizmi (2 ART) (Tabela 8).

Ostale glive iz bogatitev smo uvrstili v deblo zaprtotrošnic (Ascomycota). Lisi 6.1 in 6.2 (1R2A) sta pokazali pripadnost rodu *Saccharomyces*, lisa 6.7 (2 R2A) pa je pripadala organizmu iz reda Saccharomycetales (Tabela 8).

Za lisi 6.6 in 6.10 so bili rezultati o najbližjih sorodnikih precej različni. Večina se je uvrščala med mitosporne zaprtotrošnice (Tabela 8).

Tabela 8: filogenetska uvrstitev izbranih gliv v bogatitvah z vcepki aktivnega blata, glede na nukleotidna zaporedja.

Oznaka lise	Sorodniki	Višja taksonomska uvrstitev	Stopnja sorodnosti
6.1 Dolžina nukl.zap.: 368 bp	EU011664 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	0,995
	EF212442 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycotina	0,995
	BR000309 <i>Saccharomyces paradoxus</i>	Saccharomycetes	0,995
	EF153845 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	0,995
	EF153844 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetaceae	0,995
6.2 Dolžina nukl.zap.: 368 bp	EU011664 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascomycota	0,989
	EF212442 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycotina	0,989
	BR000309 <i>Saccharomyces paradoxus</i>	Saccharomycetes	0,989
	EF153845 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetales	0,989
	EF153844 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saccharomycetaceae	0,989
6.6 Dolžina nukl.zap.: 312 bp	AY392130 <i>Acremonium</i> sp.	Ascomycota mitosporne Ascomycota	0,927
	AF049152 <i>Stanjemonium ochroroseum</i>		0,927
	AF049151 <i>Stanjemonium grisellum</i>		0,927
	AF049148 <i>Stanjemonium fuscescens</i>		0,927
	AY489687 <i>Nectriopsis violacea</i>	Ascomy. Pezizomycotina Sordariomycetes	0,927
6.7 Dolžina nukl.zap.: 297 bp	EF120591 <i>Lodderomyces elongisporus</i>	Ascomycota	0,983
	EU348785 <i>Candida tropicalis</i>	Saccharomycotina	0,980
	EF141326 <i>Candida parapsilosis</i>	Saccharomycetes	0,980
	EF120593 <i>Candida neerlandica</i>	Saccharomycetales	0,980
	EF120585 <i>Candida</i> sp.		0,980
6.8 Dolžina nukl.zap.: 240 bp	AJ864616 <i>Orpinomyces</i> sp.	Neocallimastigomycota	0,930
	DQ322625 <i>Neocallimastix</i> sp.	Neocallimastigomycetes	0,930
	DQ536481 <i>Cyllamyces aberensis</i>	Neocallimastigales	0,930
	AJ864615 <i>Orpinomyces</i> sp.	Neocallimastigaceae	0,926
	AF164245 <i>Powellomyces</i> sp.	Chytridiomycota, Chytridiomycetes	0,921
6.9 Dolžina nukl.zap.: 231 bp	DQ536481 <i>Cyllamyces aberensis</i>	Neocallimastigomycota	0,923
	AJ864616 <i>Orpinomyces</i> sp.	Neocallimastigomycetes	0,923
	DQ322625 <i>Neocallimastix</i> sp.	Neocallimastigales	0,923
	M59761 <i>Neocallimastix</i> sp.	Neocallimastigaceae	0,923
	AJ864615 <i>Orpinomyces</i> sp.		0,919
6.10 Dolžina nukl.zap.: 380 bp	EU167575 <i>Phoma medicaginis</i>	Ascomycota	0,987
	EU167568 <i>Phoma sojicola</i>	mitosporne Ascomycota	0,987
	EU167567 <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>		0,987
	EF114726 <i>Platychora ulmi</i>	Ascomy. Pezizomycotina Dothideomycetes	0,987
	AY642516 <i>Coniothyrium insitivum</i>	Pleosporomycetidae Pleosporales	0,987

4.2 Preizkus pripravljenega vcepka v modelu čistilne naprave (MČN)

Namen tega diplomskega dela je bil pripraviti učinkovit vcepek za čiščenje slane odpadne vode, zato smo solinske organizme vseh treh izhodnih vzorcev, ki smo jih bogatili v gojiščih ART, vcepili v enega od MČN (IN1) (slika 4). Gojišča ART so po sestavi in razgradljivosti, glede na test BPK₅, najbolj ustrezala sestavi slanih izcednih voda, ki pritečejo v čistilno napravo in spremenijo razmere. Za primerjavo smo imeli postavljen še MČN brez vcepka (C0) in dva MČN z vcepki solinskih organizmov, ki niso bili vnaprej izpostavljeni razmeram, ki ustrezajo slani odpadni vodi. Eden od teh dveh MČN je imel v gojišče dodanega 17 odstotkov NaCl (IN3), ostali pa 1,5 odstotka NaCl.

4.2.1 Rastne krivulje

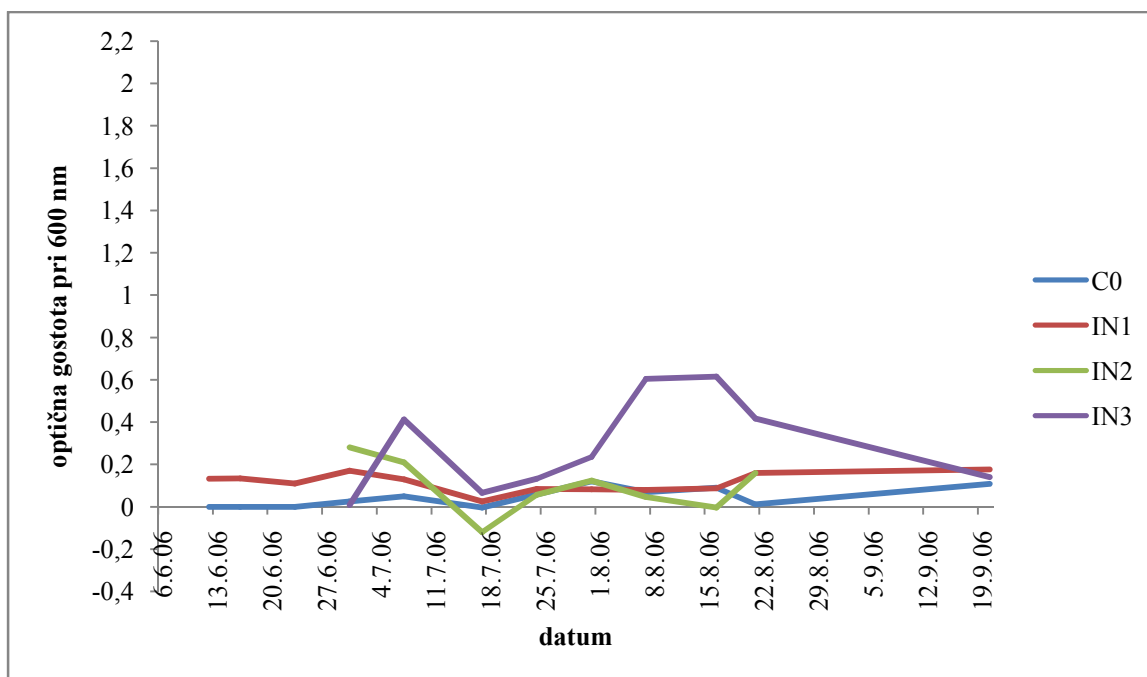
Za vpogled v mikrobovo dogajanje v MČN smo merili OG gojišča. Vzorčili smo v usedalniku pred iztokom iz MČN (Slika 4).

Iz rastnih krivulj je bilo razvidno, da je bila v večini primerov najvišja vrednost OG izmerjena v MČN IN3, ki je imel 17-odstotno slanost. Ti rezultati niso nujno pomenili najvišje stopnje rasti organizmov.

V MČN IN1 z vcepljeno združbo predhodno gojenih solinskih organizmov nismo opazili velikih nihanj v OG, torej se stopnja rasti mikroorganizmov ni bistveno spreminjala. OG je bila v MČN IN1, v primerjavi z OG v kontrolnem MČN, v večini meritev višja (Slika 16). To je bilo najbolj očitno v začetnih meritvah, ko so bili organizmi v MČN IN1 številčnejši, pri osmem merjenju (31.7.06) pa je bila OG v kontrolnem MČN prvič višja od OG v MČN IN1. Kasneje je bila višja še enkrat, nato pa do konca merjenja nižja od vrednosti OG v MČN IN1. V MČN IN1 smo opazili spreminjanje barve, ki je bila v začetku rumena, kasneje rdečkasta, ob končnih merjenjih pa rumeno-rjava.

OG v MČN IN2 je zelo nihala (Slika 16), kar kaže na prilagajanje združbe iz okolja na razmere z več organskimi snovmi. V tem MČN je bilo pred zadnjim merjenjem izklopljeno zračenje zaradi pomanjkanja opreme, vsebina je bila črna, zato meritve nismo izvedli.

V času izvajanja meritev smo imeli precej tehničnih težav z opremo, saj je bila la-ta prilagojena za akvarije (črpalka in prezračevalnik) in infuzijo (cevka za doziranje), zato je bilo potrebno zelo pogosto čiščenje ali celo menjava delov.



Slika 16: spreminjanje optične gostote v modelih čistilnih naprav.

V MČN so bili vcepljeni solinski organizmi, le v kontrolnem modelu ni bilo vcepka. Sveže gojišče smo dodajali v dvodnevni presledkih. C0 označuje kontrolni model, ki ni imel vcepljenih organizmov, IN1 označuje MČN z vcepkom solinskih mikroorganizmov, ki so bili obogateni v slanih gojiščih ART, IN2 in IN3 označujeta MČN z vcepljenimi solinskimi organizmi brez predhodnega gojenja. Slanost (delež NaCl) v gojišču MČN IN3 je 17-odstotna, v ostalih treh MČN pa 1,5-odstotna.

4.2.2 Rezultati testa BPK₅ za vtoke in iztoke iz modelov čistilnih naprav

S testom BPK₅ dobimo podatke o tem, koliko kisika je mikrobna združba porabila za oksidacijo organskih snovi v vodi. Če merimo BPK₅ v vtoku in iztoku iz modela, posredno dobimo informacijo o tem, koliko organskih snovi je bilo v vodi preden jo je mikrobna združba čistila, in koliko organskih snovi je v vodi ostalo po prehodu skozi model čistilne naprave z vcepljeno, in tudi sicer prisotno, mikrobno združbo. Iz razlik lahko ugotovimo uspešnost mikrobne združbe v modelu pri razgrajevanju organskih snovi v vodi.

Začetni datum testa 4.9.2006:

V vseh modelih, z izjemo modela IN3 s 17 odstotki NaCl, je bila učinkovitost odstranjevanja organskih snovi nad 90-odstotna. Najbolj učinkovita pri odstranjevanju organskih snovi je bila združba v modelu IN1, kamor so bili vcepljeni mikroorganizmi, predhodno prilagojeni na gojišče (Tabela 9, Slika 17).

Tabela 9: izmerjena potreba po kisiku v vtoku in iztoku iz posameznega modela ter njegova učinkovitost čiščenja (4. do 8.9.2006).

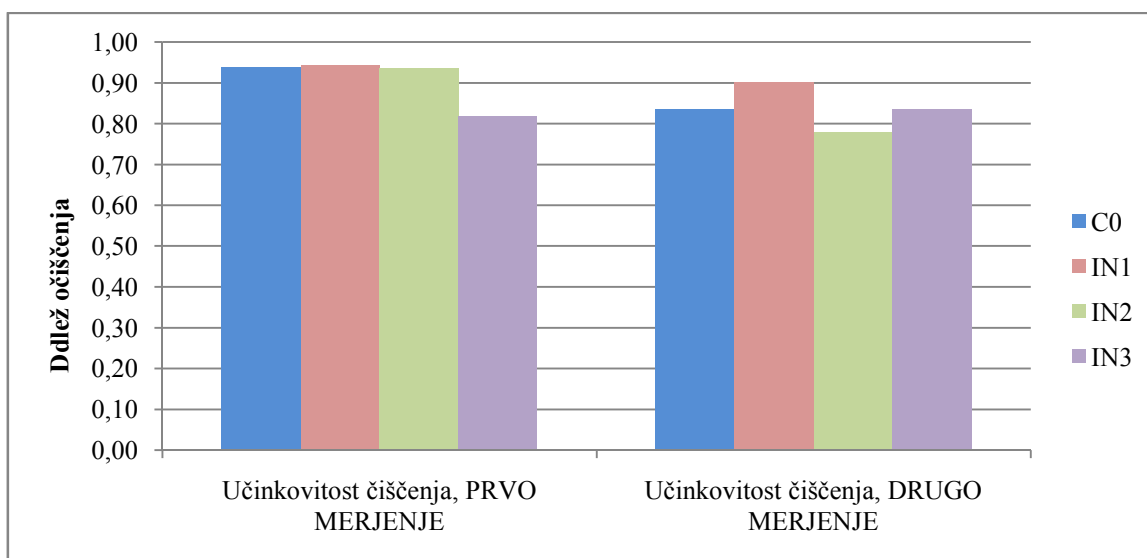
MODEL	VTOK (poraba O ₂)	IZTOK (poraba O ₂)	Učinkovitost čiščenja
C0	320 mg/l (100%)	20 mg/l (6,25%)	93,75%
IN1	350 mg/l (100%)	20 mg/l (5,71%)	94,29%
IN2	310 mg/l (100%)	20 mg/l (6,45%)	93,55%
IN3	220 mg/l (100%)	40 mg/l (18,18%)	81,82%

Začetni datum testa 10.9.2006:

V drugem testu BPK5 so bile vrednosti na vtokih v modele precej nižje kot v prvem merjenju, kar je bilo nenavadno, saj je bila sestava gojišča, ki je teklo v modele, enaka. Učinkovitost čiščenja, izražena v odstotkih, je bila zato precej nižja. 90-odstotno učinkovitost je dosegla le združba v modelu IN1 (Tabela 10, Slika 17).

Tabela 10: izmerjena potreba po kisiku v vtoku in iztoku iz posameznega modela ter njegova učinkovitost čiščenja (10. do 14.9.2006).

MODEL	VTOK (poraba O ₂)	IZTOK (poraba O ₂)	Učinkovitost čiščenja
C0	120 mg/l (100%)	20 mg/l (16,67%)	83,33%
IN1	100 mg/l (100%)	10 mg/l (10,00%)	90,00%
IN2	180 mg/l (100%)	40 mg/l (22,22%)	77,78%
IN3	120 mg/l (100%)	20 mg/l (16,67%)	83,33%



Slika 17: grafična ponazoritev učinkovitosti čiščenja v modelih v prvem in drugem merjenju BPK₅.

Zaradi razlik v vrednosti BPK_5 na vtokih, smo pogledali še povprečno učinkovitost čiščenja. Izkazalo se je, da je bila združba v kontrolnem modelu 90-odstotno učinkovita, združba modela IN1 je 93-odstotno odstranila organske snovi (najvišja učinkovitost), združba v modelu IN2 je bila učinkovita v povprečju 87-odstotno, združba v IN3 pa 82-odstotno.

4.2.3 Molekularna analiza združb v modelih čistilnih naprav

Molekularno analizo združb v modelih čistilnih naprav smo izvedli zaradi natančnejšega vpogleda v spreminjanje in sestavo bakterijskih in glivnih združb tekom vzorčenja. Uporabljene metode so bile enake, kot pri molekularni analizi združb v bogatitvah, ki so opisane v poglavju 4.1.2.

4.2.3.1 ANALIZA BAKTERIJSKIH ZDRUŽB

a) Pomnoževanje dela 16S rDNA z verižno reakcijo s polimerazo Taq (PCR)

Metoda je opisana v podpoglavju 4.1.2.1, saj smo uporabili enak postopek pomnoževanja s PCR kot pri analizi bakterijskih združb v bogatitvah.

b) TTGE (gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom) za analizo bakterijskih združb v modelih čistilnih naprav

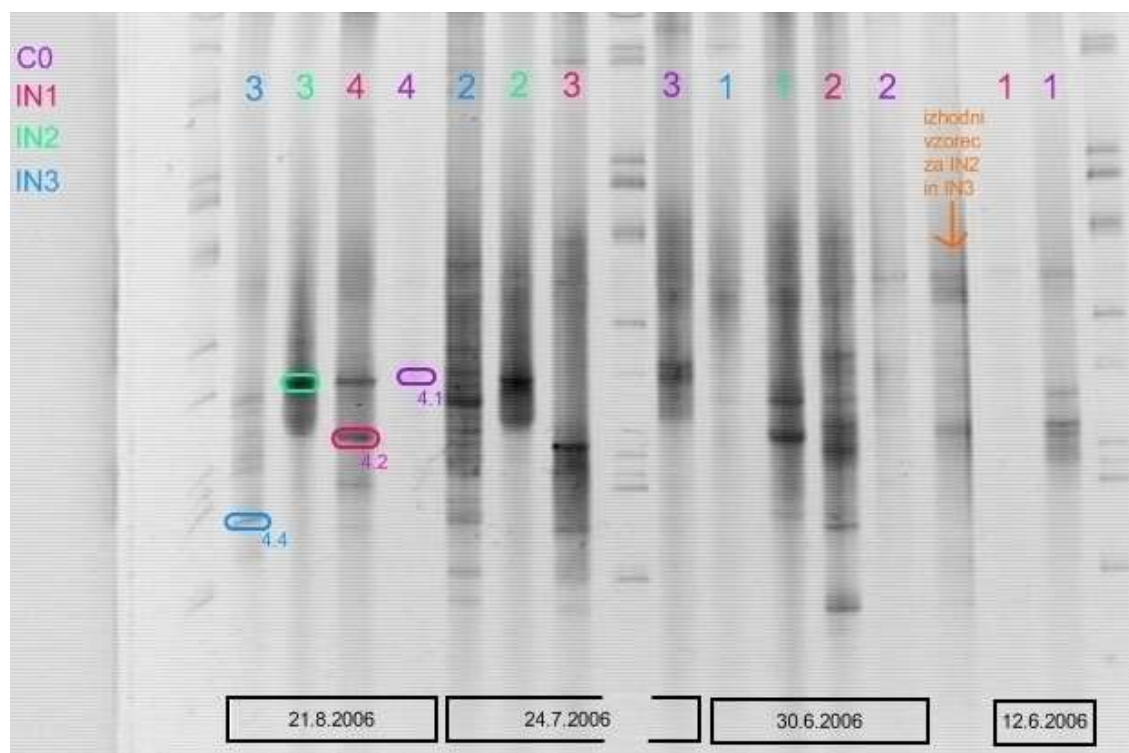
Na poliakrilamidni gel smo nanašali z metodo PCR pomnožene dele genov za bakterijsko 16S rRNA. S TTGE smo naredili profile bakterijskih združb, ki smo jih vzorčili iz MČN.

4.2.3.1.1 TTGE profili in filogenetska uvrstitev bakterij v modelih čistilnih naprav

V kontrolnem MČN (C0) je bilo opazno zmanjševanje števila lis v profilu združbe, Ob zadnjem vzorčenju je bila na gelu vidna le še ena lisa (4.1) (Slika 18), ki smo jo izbrali za nadaljnjo analizo.

V MČN z vcepkom predhodno gojenih solinskih organizmov (IN1) je bilo največ lis v profilu bakterijske združbe vidnih v drugem vzorčenju. V zadnjem vzorčenju sta bili najbolj izraziti dve lisi (Slika 18), od katerih smo si eno (4.2) izbrali za nadaljnjo analizo. Za analizo druge lise se nismo odločili, ker smo izbrali iz profila združbe iz MČN IN2 liso, ki je na enaki razdalji. Žal nam ni uspelo uspešno pomnožiti DNA te lise za določitev nukleotidnega zaporedja.

V MČN IN3 je bila ob zadnjem (tretjem) vzorčenju najbolj izrazita lisa 4.4 (Slika 18), katere DNA smo pomnožili in določili njeno nukleotidno zaporedje ter sorodstvo.



Slika 18: TTGE profili bakterijskih združb, ki smo jih gojili v modelih čistilnih naprav.

Številke na vrhu stolpcev označujejo zaporedje vzorčenj za posamezen model, po barvi pa se ločijo različni modeli, iz katerih smo vzorčili. V tretjem stolpcu od desne proti levi (brez lestvice) je profil izhodnega solinskega vzorca, ki smo ga vcepili v modela IN2 in IN3, nabran pa je bil 23. junija 2006. C0-model brez vcepka, gojišče ART (1,5 odstotka NaCl), IN1-model z vcepkom gojenih solinskih organizmov, Gojišče ART (1,5 odstotka NaCl), IN2-model z vcepkom solinskih organizmov iz okolja, gojišče ART (1,5 odstotka NaCl), IN3- model z vcepkom solinskih organizmov iz okolja, gojišče ART (17 odstotkov NaCl). Obkrožene in oštevilčene so lise, iz katerih smo določali nukleotidno zaporedje DNA.

Filogenetska pripadnost izbranih bakterij v modelih čistilnih naprav:

V kontrolnem modelu (C0) se je v zadnjem vzorčenju ohranil organizem iz sorodstva bakterijskega rodu *Halomonas* (lisa 4.1 (slika 18), Tabela 11).

Zaradi očitne prisotnosti dveh nukleotidnih zaporedij v lisi 4.2, je rezultat, ki je prikazan v tabeli 11, predstavljal le eno od možnosti za uvrstitev te DNA v sorodstvo. Kaže sicer pripadnost rodu *Acinetobacter*, vendar je stopnja sorodnosti zelo nizka in je rezultat lahko nepravilen.

Organizem, ki mu je pripadala DNA iz lise 4.4 (slika 18), je verjetno sorodnik bakterijskega rodu *Comamonas*, vendar je bila dolžina in kvaliteta nukleotidnega zaporedja DNA lise tudi tu precej nezanesljiva.

Tabela 11: filogenetska pripadnost izbranih bakterij v modelih čistilnih naprav, glede na nukleotidna zaporedja.

Oznaka lise	Sorodniki	Višja taksonomska uvrstitev	Stopnja sorodnosti
4.1 Dolžina nukl.zap.: 378 bp	negojljiv <i>Halomonas</i> sp. AY687521	ph. Proteobacteria	0,981
	negojljiv <i>Halomonas</i> sp. AY687526	cl. Gammaproteobacteria	0,981
	negojljiv <i>Halomonas</i> sp. AY687547	o. Oceanospirillales	0,981
	negojljiv <i>Halomonas</i> sp. AY687550	f. Halomonadaceae	0,981
	negojljiv <i>Halomonas</i> sp. AY687564	g. Halomonas	0,981
4.2 Dolžina nukl.zap.: 184 bp	negojljiva bakterija AY963319	ph. Proteobacteria	0,935
	<i>Acinetobacter</i> sp. AJ291843	cl. Gammaproteobacteria	0,929
	negojljiva bakterija DQ675064	o. Pseudomonadales	0,929
	<i>Acinetobacter</i> sp. EF412969	f. Moraxellaceae	0,918
	negojljiva bakterija AY604050	g. Acinetobacter	0,918
4.4 Dolžina nukl.zap.: 170 bp	<i>Comamonas testosteroni</i> AF519533	ph. Proteobacteria	0,971
	<i>Comamonas</i> sp. AF501881	cl. Betaproteobacteria	0,971
	<i>Comamonas testosteroni</i> AF501880	o. Burkholderiales	0,971
	<i>Comamonas terrigena</i> AJ420326	f. Comamonadaceae	0,964
	<i>Comamonas terrigena</i> AB021418	g. Comamonas	0,953

4.2.3.2 ANALIZA GLIVNIH ZDRUŽB

a) Pomnoževanje dela 18S rDNA z verižno reakcijo s polimerazo Taq (PCR)

Metoda pomnoževanja 18S rDNA s polvgnezdeno PCR je bila enaka kot pri glivah iz bogatitev.

b) TTGE (gelska elektroforeza s časovno določenim temperaturnim gradientom) za analizo glivnih združb bogatitev

Na poliakrilamidni gel smo nanесли s polvgnezdeno PCR reakcijo pomnožene dele gena, ki določa glivno 18S rRNA pri organizmih iz različnih vzorčenj iz modelov čistilnih naprav.

4.2.3.2.1 TTGE profili in filogenetska uvrstitev gliv v modelih čistilnih naprav

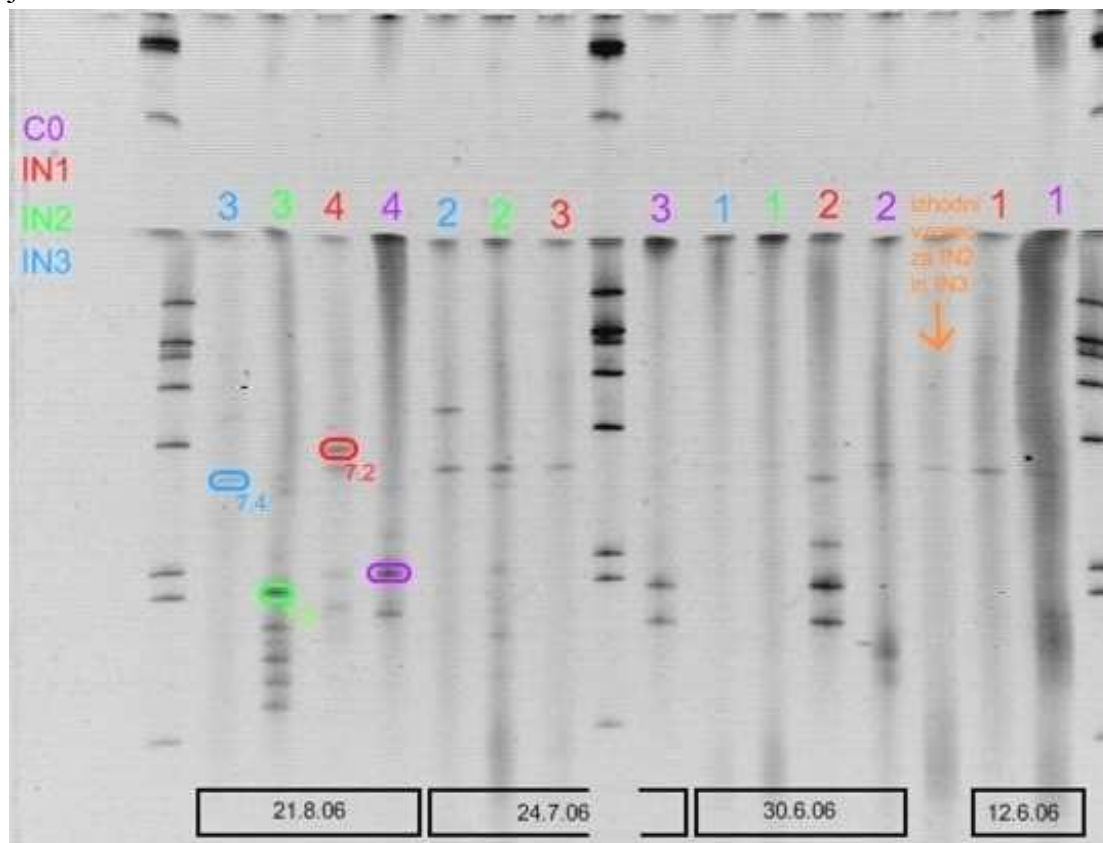
V kontrolnem MČN (C0) sta se ob tretjem vzorčenju pojavili dve dominantni lisi. Ena od njiju je bila v zadnjem vzorčenju močnejše izražena (Slika 19), zato smo jo izbrali za nadaljnjo analizo, vendar žal pomnoževanje DNA ni bilo uspešno.

Število vidnih lis v profilu združbe iz MČN IN1 je nihalo. V prvem vzorčenju sta bili komaj vidni dve lisi, v drugem pa je bilo prisotnih več dobro vidnih lis. V tretjem vzorčenju je bila le ena vidna lisa, v zadnjem pa je bilo prisotnih več, vendar ne zelo izrazitih, lis. V tem vzorčenju se je pojavila lisa na lokaciji, kjer v profilih prejšnjih

vzorčenj ni bilo vidnih lis, in je bila hkrati tudi najbolj izrazita (Slika 19). To smo si tudi izbrali za nadaljnjo analizo.

V MČN IN2 je z vsakim vzorčenjem naraščalo število lis v profilu (Slika 19). Za analizo smo si izbrali najmočnejše izraženo liso v profilu zadnjega vzorčenja.

MČN IN3 ob prvem vzorčenju ni kazal vrstne pestrosti, ob drugem vzorčenju sta bili dobro vidni dve lisi, ki sta v profilu združbe zadnjega vzorca zbledeli (Slika 19). Močnejšo od njiju smo izbrali za uvrstitev v sorodstvo.



Slika 19: TTGE profili glivnih (18S rDNA) združb, ki smo jih izolirali iz modelov čistilnih naprav.

Z barvami so označeni različni modeli, iz katerih smo vzorčili, številke pa kažejo, katero vzorčenje za posamezen model je bilo izvedeno. Datumi vzorčenj so spodaj na sliki. C0-model brez vcepka, gojišče ART (1,5 odstotka NaCl), IN1-model z vcepkom gojenih solinskih organizmov, Gojišče ART (1,5 odstotka NaCl), IN2-model z vcepkom solinskih organizmov iz okolja, gojišče ART (1,5 odstotka NaCl), IN3-model z vcepkom solinskih organizmov iz okolja, gojišče ART (17 odstotkov NaCl). Obkrožene in oštevilčene so lise, iz katerih smo določali nukleotidno zaporedje DNA.

Določitev filogenetske pripadnosti izbranih gliv iz modelov čistilnih naprav:

DNA iz lise v združbi kontrolnega modela (C0), ki smo jo določili za nadaljnjo analizo, žal nismo mogli uspešno pomnožiti, zato nimamo rezultatov.

Izbrana lisa (7.2) iz glivne združbe modela z vcepkom vnaprej gojenih solinskih organizmov je pripadala organizmu iz debla zaprtotrosovnic (Ascomycota), nadaljnja uvrstitev je z 80-odstotno verjetnostjo v razred Dothideomycetes, eden od sorodnikov pa pripada mitospornim zaprtotrosovnicam (Tabela 12).

Podobno sorodstvo, kot organizem z DNA iz 7.2, ima organizem, ki mu je pripadala DNA iz lise 7.3 v združbi modela z vcepljenimi solinskimi organizmi iz okolja (IN2).

Za organizem iz lise 7.4, ki je bil izbran iz modela z visoko slanostjo, kot primer uspešnega organizma v razmerah 17-odstotne slanosti, smo lahko določili le pripadnost med zaprtotrosonice in njihovo poddeblo *Pezizomycotina*, v katerem pa so najbližji sorodniki organizma pripadali različnim razredom (Tabela 12).

Tabela 12: sorodstvo izbranih gliv iz modelov čistilnih naprav, glede na nukleotidna zaporedja.

Oznaka lise	Sorodniki	Višja taksonomska uvrstitev	Stopnja sorodnosti
7.2 Dolžina nukl.zap.: 260 bp	EU547495 <i>Aureobasidium pullulans</i>	Ascomycota	0,988
	EU167608 <i>Kabatiella microsticta</i>	Pezizomycotina	0,988
	EU167576 <i>Kabatiella caulivora</i>	Dothideomycetes	0,988
	EF114724 <i>Phaeocryptopus nudus</i>		0,988
	EF114731 <i>Rhizosphaera kalkhoffii</i>	Ascomycota Mitosporne Ascomycota	0,988
7.3 Dolžina nukl.zap.: 380 bp	EU167604 <i>Phaeosphaeria rousseliana</i>	Ascomycota	0,976
	EU167573 <i>Didymella bryoniae</i>	Pezizomycotina	0,976
	EU167570 <i>Didymella phacae</i>	Dothideomycetes	0,976
	EU167575 <i>Phoma medicaginis</i>	Ascomycota	0,976
	EU167567 <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	Mitosporne Ascomycota	0,976
7.4 Dolžina nukl.zap.: 221 bp	AY357274 <i>Dimorphospora foliicola</i>		0,995
	AY856945 <i>Helicodendron paradoxum</i>	Ascomycota	0,995
	AY544709 <i>Morchella cf. elata</i>	Pezizomycotina	0,995
	EF204513 <i>Diplococcium spicatum</i>	Različni razredi	0,995
	EU167608 <i>Kabatiella microsticta</i>		0,995

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

Za čiščenje odpadne vode s povišano slanostjo je potrebna posebna združba mikroorganizmov, ki so sposobni iz odpadne vode odstranjevati organske snovi, poleg tega pa so prilagojeni na povišano koncentracijo NaCl.

Mikroorganizme, ki so prilagojeni na veliko količino organskih snovi in le-te tudi razgrajujejo in s tem odstranjujejo iz vode, najdemo v čistilnih napravah. V združbi aktivnega blata so mikroorganizmi razporejeni v različne ekološke niše. Vsaka skupina opravlja svoj del pretvorbe snovi in elementov, s tem pa pridobi energijo za svojo rast. V razmerah brez motenj lahko ti procesi potekajo zelo uspešno. Učinkovitost mikrobne razgradnje pa se lahko občutno zmanjša, če se pojavi kakršnakoli motnja, ki povzroči manj ugodne razmere za življenje mikroorganizmov. Taka motnja je lahko tudi povišana koncentracija soli, ki spremeni ozmotske razmere v okolju mikroorganizmov.

V nasprotju s tem pa so v slanih okoljih (na primer v solinah) mikrobne združbe prilagojene na zelo drugačne ozmotske razmere kot organizmi v tipični čistilni napravi. Sposobne so prenesti veliko nihanje koncentracije soli.

V raziskavi smo preizkušali možnost uporabe mikroorganizmov iz slanega okolja za čiščenje slane odpadne vode. Ugotavljali smo, če je potrebno take mikroorganizme predhodno prilagoditi na slano odpadno vodo, ali so pri čiščenju dovolj učinkoviti že neprilagojeni mikroorganizmi iz solin, ki se šele v čistilni napravi soočijo z veliko količino organskih snovi.

Opazovali smo tudi spreminjanje strukture združbe tekom prilagajanja na razmere v slani, organsko bogati odpadni vodi in kateri organizmi (bakterije in glive) so prisotni v združbi, prilagojeni na tako odpadno vodo.

5.1.1 Priprava vcepka za čiščenje slane odpadne vode

Za najbolj uničujoč dejavnik v slani odpadni vodi velja hitro spreminjanje koncentracije soli. Mikroorganizmi imajo, zaradi hitre menjave generacij in tudi zaradi možnosti horizontalnih prenosov odpornostnih genov, sposobnost hitre prilagoditve na nove razmere v okolju. Če se pojavi nek stresni dejavnik, preživijo organizmi, ki imajo ustrezne gene, in tisti, pri katerih se lahko zaradi mutacij na novo pojavijo geni, ki jim omogočajo preživetje novih razmer. Kljub tem sposobnostim mikroorganizmov pa lahko zelo hitra sprememba okolja povzroči velik upad v njihovem številu, po katerem lahko traja zelo dolgo, da si združba opomore. V primeru, mikroorganizmov, ki čistijo odpadno vodo, lahko pomeni tako zdesetkanje mikrobne populacije velik upad v učinkovitosti odstranjevanja snovi. To vodi v veliko povišanje koncentracije organskih snovi v iztoku iz čistilne naprave in vpliva na okolje, kamor taka voda priteče. Ker do takih izpustov ne bi smelo prihajati, bi bilo

najbolje imeti pripravljene mikrobne združbe, ki so sposobne preživeti in oksidirati snovi v različnih razmerah, tudi v zelo slani odpadni vodi.

Povišanje slanosti zahteva zelo kompleksne prilagoditve mikroorganizmov, da le-ti lahko preživijo. Organizmi, ki živijo v solinah, so z evolucijo razvili mehanizme za preživetje v velikem razponu slanosti, saj se ozmotske razmere v takih okoljih lahko zelo spreminjajo s spreminjanjem dejavnikov okolja (temperatura, padavine...). Če želimo pridobiti mikroorganizme, ki so prilagojeni na slane razmere, jih moramo torej iskati v okoljih, kjer vladajo take razmere.

V različnih ekstremno slanih okoljih so našli pestre združbe obligatnih kemolitoavtotrofnih žveplo-oksidirajočih bakterij. Nekateri od teh organizmov pa so se izkazali tudi za učinkovite v procesu denitrifikacije (Sorokin, 2007).

Kargi in Dinçer (1998) sta raziskovala možnosti uporabe halotolerantne arheje *Halobacter halobium* za obogatitev aktivnega blata ob čiščenju slane odpadne vode. Izkazalo se je, da so zaviralni učinki soli na učinkovitost čiščenja zelo omiljeni, ko so v združbi prisotne te arheje. To je bilo najbolj opazno pri več kot 3-odstotni koncentraciji NaCl. Ista avtorja sta leta 2001 preučevala vpliv soli v odpadni vodi na proces nitrifikacije, ki ga je opravljala združba aktivnega blata, neobogatena s halotolerantnimi organizmi. V taki združbi so opravljale proces nitrifikacije bakterije iz rodov *Nitrosomonas* in *Nitrobacter*. V primeru odpadne vode brez soli, je skoraj popolna nitrifikacija potekla v 12 dneh, ko je bila koncentracija NaCl v odpadni vodi 3-odstotna, pa je z enako začetno mikrobno združbo proces trajal 25 dni. V tem času je bila pri 3-odstotni slanosti učinkovitost nitrifikacije 96-odstotna, medtem ko je bila ob prisotnosti 5 odstotkov NaCl učinkovitost le še 80-odstotna (Dinçer in Kargi, 2001).

V prvi stopnji priprave združbe mikroorganizmov, ki bi bili najbolj primerni za vcepek ob povišanju slanosti v odpadni vodi, smo se v diplomskem delu odločili za gojenje mikroorganizmov, prilagojenih na velik razpon koncentracije NaCl. V Sečoveljskih solinah se slanost sezonsko spreminja in je njen razpon od 3 do 35 odstotkov NaCl (Gunde-Cimerman in sod., 2000). V gojišča, ki so po sestavi ustrezala umetni odpadni vodi, smo dodali 1,5-odstotno koncentracijo NaCl, saj je to koncentracija soli, ki se najbolj pogosto pojavi v čistilnih napravah ob vdoru morske vode v sistem ali ob spiranju soljenih cestišč in vdoru meteorne vode v sisteme čistilnih naprav. Uporabili smo dve vrsti gojišč, od katerih je bilo eno bolj, drugo pa manj bogato z organskimi snovmi. Glede BPK₅ bogatejše gojišče (R2A) bolj ustreza razmeram v organsko obremenjeni vodi, ki se čisti v bazenih čistilnih naprav, revnejše gojišče (ART) pa je bolj podobno razredčeni odpadni vodi, ki je v praksi posledica vdora površinske izcedne vode v kanalizacijski sistem. Razlika v sestavi gojišč, glede organskih snovi, je bila vzrok za razhajanja v izmerjeni OG v bogatitvah z eno in drugo vrsto gojišča.

Sol v odpadni vodi, zaradi zaviranja razvoja nitastih bakterij in praživali, zmanjša sposobnost povezovanja mikroorganizmov v kosme, zaviraen vpliv pa ima tudi na

nitrifikacijo (Kargi in Dinçer, 1998). Zanimalo nas je, kako vpliva sol v gojišču na odzivnost združb mikroorganizmov, ki so prilagojeni na slane razmere in manj organskih snovi, in mikroorganizmov, ki so prilagojeni na prisotnost organskih snovi in manjšo slanost. En način, da bi to ugotovili, je bilo merjenje OG ob bogatenju mikroorganizmov iz obeh okolij v gojiščih z dodatkom soli. Ugotoviti smo hoteli, po kolikšnem času se zmanjšajo nihanja v številu organizmov ob dodatku svežega gojišča.

5.1.1.1 Spremembe števila mikroorganizmov v bogatitvah

Za mikrobne združbe je znano, da se lahko v optimalnih razmerah hitro razmnožujejo. Ker pa je gojišče (ali drugo okolje), katerega naselijo, prostorsko omejeno, rast populacije ne more biti neomejena. Če pomanjkanje hranil lahko zavre mikrobno rast. Sicer pa mikrobne populacije poznajo tudi druge mehanizme uravnavanja rasti populacije v omejenem prostoru. Tak mehanizem je tudi tako imenovani quorum sensing (QS), ki pomeni zaznavanje gostote populacije s signalnimi molekulami (March in Bentley, 2004). S tem mehanizmom koncentriranja signalnih molekul ob zgostitvi populacije, se izoblikovane mikrobne združbe izognejo prevelikim skokom v številu celic, ki bi pomenile potrat energije in vodile v kasnejše odmiranje celic zaradi pomanjkanja hrane. Če je QS medvrsten, lahko vpliva tudi na vrstno strukturo združbe.

Na število mikrobnih celic v gojišču lahko vpliva tudi prisotnost virusne DNA ali profagov v celicah. Ti so lahko v lizogeni fazi prisotni več generacij, nato pa se aktivirajo ob stiku celice s stresnim dejavnikom. Ko tako preidejo v litično fazo, povzročijo propad celic in posledično sprostitev celičnega materiala v okolico (Cochran in sod., 1998). To lahko vodi v kasnejši ponovni dvig števila mikroorganizmov zaradi dostopnih organskih snovi, vendar se potem spet pojavijo zaviralni dejavniki, ki preprečujejo preveliko namnožitev celic. Če merimo gostoto mikrobne populacije, lahko take vzpone in padce v gostoti celic tudi zaznamo.

Povišanje ali zmanjšanje optične gostote je tudi posledica vpliva soli na kosmičenje organizmov. Kosmi mikroorganizmov so pogosti v razmerah, kakršne vladajo v čistilnih napravah. Posledica kosmičenja je usedanje združenih mikroorganizmov, kar pa ima za posledico manjšo OG zaradi manjšega števila razpršenih mikroorganizmov. Kosmičijo se mikroorganizmi, ki so prilagojeni na okolje, v katerem živijo. Povišana slanost odpadne vode zmanjša kosmičenje in tako se poviša OG. Torej višja OG ne pomeni nujno več mikroorganizmov, ampak je lahko le posledica večjega števila razpršenih mikroorganizmov in manjšega števila kosmov, ki pa so sicer dobrodošla oblika združevanja mikroorganizmov, saj je odstranjevanje snovi tako bolj učinkovito.

Pri **solinskih** mikroorganizmih je umiritev nihanja številčnosti organizmov lahko znak, da je združba že bolj prilagojena na okolje z več organskimi snovmi, ki ga ustvarimo ob

dodatkih gojišča. Umiritev skokov števila organizmov lahko pomeni, da ob dodatku svežega gojišča, in z njim organskih snovi, odziv organizmov ni v hitrem razmnoževanju, ampak so že organizmi, ki so prisotni v bogatitvi, sposobni razgraditi več organskih snovi. Lahko je vzrok za manjše spremembe v številu celic tudi delovanje, prej omenjenega, mehanizma QS (March in Bentley, 2004). Njihov odziv torej ni več v zelo velikem povečevanju številčnosti združbe, ampak v boljšem izkoristku snovi. Po drugi strani pa lahko tudi v prilagojeni združbi pričakujemo odziv na dodatek novih hranil v obliki dviga rastne krivulje. Bolj pomemben podatek o dogajanju v združbi in njeni prilagoditvi na nove razmere, ki ga lahko dobimo iz merjenja optične gostote, je ohranjanje številčnosti populacije tudi nekaj časa po dodajanju gojišča.

Odziv vseh združb solinskih organizmov na dodatek gojišča je bil, z nekaj izjemami, podoben (Sliki 6 in 7). Dan po dodatku gojišča smo izmerili višjo OG, kot pred dodatkom, v naslednjih merjenjih pa smo zaznali padanje OG. Isti dan po dodatku gojišča, je bila izmerjena OG bogatitve nižja, kot pred dodatkom. To lahko pripišemo razredčenju bogatitve s svežim gojiščem.

Iz primerjave rastnih krivulj solinskih organizmov smo lahko prišli do splošne ugotovitve, da so vrednosti OG, po prenosu koncentriranih mikroorganizmov v enak volumen svežega gojišča z enako sestavo, višje od izmerjene OG v prvih gojiščih s solinskimi vcepki (Slika 7). Solinski organizmi so se očitno v treh tednih življenja v gojišču na to okolje prilagodili do te mere, da so lahko ob prenosu v sveže gojišče izkoristili snovi v okolju za svojo rast. Poleg tega je lahko zelo verjeten razlog, da so vrednosti OG v svežih gojiščih višje, prisotnost bakteriofagov (virusov) v starih gojiščih. Ti so se lahko namnožili po aktivaciji profagov v bakterijskih celicah, ki so prišle v drugačno okolje (Cochran in sod., 1998). Prehod v sveža gojišča je za celice pomenil odsotnost tega zaviralnega dejavnika v okolju. Zanimiv pojav je povišanje in ustalitev vrednosti OG skupnega solinskega vzorca v gojišču ART (123 ART+NaCl), tik pred koncem merjenja in dviganje vrednosti OG pri skupnem solinskem vzorcu v gojišču ART brez NaCl (123 ART brez NaCl) (Slika 7). Razlog bi bil lahko v tem, da je v združenem solinskem vzorcu več različnih organizmov, med katerimi se je lahko izoblikovala združba, ki se je dobro prilagodila na razmere v obeh gojiščih (s soljo in brez soli) in se začela uspešno razmnoževati.

Za organizme iz združbe **aktivnega blata** smo ustvarili stresno okolje že na začetku, ker se slanost ni spreminjala ob vsakem dodatku svežega gojišča. Tu bi bilo podatek o vplivu dodatka soli na številčnost združbe mogoče dobiti, če bi sol ali slano gojišče dodali v gojišče brez soli, kamor bi bili vcepljeni taki organizmi in bi v njem merili optično gostoto. Velika nihanja OG (Slika 8) so znak, da je združba burno reagirala na povišanje koncentracije organskih snovi. To pa ni značilnost združb v optimalnem okolju, prilagojenih na večji razpon koncentracije snovi, ki so jim na voljo. V začetku so rastne krivulje za različne bogatitve zelo različne, po dodatku svežih hranilnih snovi pa se v vseh bogatitvah organizmi odzovejo z večjo stopnjo rasti populacije. Ob drugem dodatku

gojišča je odziv podoben, ob tretjem dodatku pa v treh gojiščih rast populacije pade, v treh pa se poveča (Slika 8). Zaradi velikih padcev OG po vsakem porastu števila celic, sklepamo, da je združba aktivnega blata še zelo nestabilna in so odzivi na dodatek hranilnih snovi, s tako velikim porastom v številu celic za združbe v bogatitvah, zelo neracionalni. Pomenijo hitro porabo snovi, čemur sledi množičen propad celic.

Dogajanje v združbah, tekom prilagajanja na nove razmere, je veliko bolj kompleksno, kot le spreminjanje števila celic. Spremembe niso le kvantitativne, ampak se združba spreminja tudi glede vrstne sestave glavnih in specifičnih prilagoditev, ki jih organizmi pridobijo, torej se združbe lahko zelo spremenijo tudi kvalitativno. Zato nam podatek o OG mora služiti le kot informacija o kvantitativnih spremembah za spremljanje dogajanja in morebitno preventivno ukrepanje v primeru prevelikega odmiranja, ki bi lahko vodilo v propad združbe in konec raziskave.

Ker je v gojišču R2A na voljo več organskih snovi, je tudi število celic v bogatitvah s to sestavo gojišča ob vseh merjenjih večje, v primerjavi z bogatitvami v gojiščih ART. Za hitro namnožitev večjega števila mikroorganizmov je to gojišče bolj primerno. Tudi odzivi združb so v gojiščih R2A bolj vidni.

5.1.1.2 Spreminjanje strukture združb in glavni predstavniki

Iz TTGE profilov lahko vidimo razvoj združbe glede na pojavljanje in izginjanje dominantnih organizmov. Tako lahko približno ocenimo, po kolikšnem času se v združbi zgodi preobrat v vrstni sestavi.

Raznolikost bakterijskih združb lahko ugotavljamo z direktnimi ali posrednimi metodami. Za slednje, ki smo jih uporabili v poskusu za to diplomsko delo, je prva stopnja verižna reakcija s polimerazo *Taq* (PCR). Za nadaljnjo analizo smo uporabili posredno metodo TTGE, ki nam lahko da, z dodatnimi postopki, tudi filogenetske podatke o bakterijah, katerih fragmeti 16S rDNA so se ločili na poliakrilamidnem gelu (Lapanje, 2005).

Glive so organizmi, ki v veliki meri prispevajo k procesom za normalno delovanje ekosistemov, tudi pri razgradnji organskih snovi. Čeprav imajo zelo pomembno vlogo, je o njihovi naravni raznolikosti relativno malo znanega. Po nekaterih raziskavah je uradno opisanih le 5 do 10 odstotkov glivnih vrst, prisotnih v naravnih ekosistemih. Dokler so se uporabljale le gojitvene tehnike, je bila glavna ovira za raziskave glivnih združb iz okolja težavnost ločitve delcev od biomase, še ena težava pa je bila pomanjkanje gojišč, primernih za vse taksone v združbi (Anderson in sod., 2003). Sedaj je znano, da lahko na podoben način kot pri ugotavljanju strukture bakterijskih združb, tudi za glivne uporabljamo molekularne metode, pri katerih je tudi tu temeljna reakcija PCR. Razlika je v tem, da pri raziskavah glivnih združb navadno pomnožujemo gen (del gena) za 18S rRNA

ali pa ITS (internal transcribed spacer) regijo. V tej diplomski nalogi smo se odločili za preučevanje strukture glivnih populacij na podlagi gena za 18S rRNA.

Pri **prvem solinskem vzorcu** je lepo vidna sprememba v strukturi združbe, in sicer za bogatitev v gojišču ART v tretjem vzorčenju (po približno dveh tednih, Slika 10), za bogatitev 1 R2A pa se nove lise pojavijo že v drugem vzorčenju (v času enega tedna, Slika 10), kasneje pa se le spreminja njihova intenzivnost. Sama struktura združbe pa je do konca zelo podobna. Pri bogatitvi s **tretjim solinskim vzorcem** je preobrat v strukturi združbe v gojišču ART pred drugim vzorčenjem (v času enega tedna, Slika 11), v gojišču R2A pa pred zadnjim, četrtem, vzorčenjem ni možno zaznati preobrata, ki bi mu sledila konstantna vrstna sestava. Eden od dominantnih organizmov zadnjega vzorčenja pa je sicer, po intenzivnosti lise sodeč, dominanten organizem že v prvem vzorčenju. Torej bi lahko eventualno uporabili že to združbo.

Nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA je uporaben evolucijski marker, z njegovo pomočjo si lahko pomagamo pri določanju bakterijskih vrst v vzorcih, saj navadno raznolikost 16S rRNA sovпада z genetsko raznolikostjo bakterijskih vrst (Lapanje, 2005). Bakterijske združbe v bogatitvah solinskih mikroorganizmov (Tabeli 4 in 5) vsebujejo ob končnih vzorčenjih iz gojišč v večini predstavnike halofilnih in halotolerantnih organizmov (*Marinobacter*, *Halomonas*, *Idiomarina*). Ti organizmi so sposobni preživeti v okolju z več organskimi snovmi, torej so se sposobni prilagoditi na take razmere. Take sposobnosti solinskih mikroorganizmov pa niti niso presenetljive, saj je v evtrofnih bazenih Sečoveljskih solin dostopnost hranil dovolj velika (Gunde-Cimerman in sod., 2000). Že Sorokin (2007) opisuje prisotnost žveplo-oksidirajočih bakterij v ekstremno slanih okoljih. Vsi obligatni kemolitavtotrofni organizmi iz njegove raziskave so spadali v razred Gammaproteobacteria, tako kot bakterijski solinski organizmi v bogatitvah v naši raziskavi.

Med glivnimi predstavniki (Tabela 7) pa v končnih združbah najdemo največ predstavnikov iz reda kvasovk *Saccharomycetales* (*Saccharomyces*, *Candida*), ki niso tipični halofilni organizmi, vendar so se očitno sposobni prilagoditi tudi na razmere v slani odpadni vodi. Zanimivo je, da je kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, ki sicer po nekaterih virih velja za občutljivo na sol (Turk in sod., 2004), v dveh gojiščih z NaCl (bogatitvi 1 R2A in 3 ART) postala dominanten glivni organizem. V gojišču brez soli je prisotna v začetku gojenja, kasneje pa je v profilu združbe njena lisa zbledela (Slika 14). Morda je njeno pojavljanje in uspešno razmnoževanje v gojiščih s soljo povezano s hkratno prisotnostjo organskih snovi in je za kvasovko kombinacija obojega ugodno okolje. Za kvasovko vrste *Candida tropicalis*, katere DNA je bila v eni od dveh najbolj intenzivnih lis TTGE profila solinske glivne združbe prvega vzorca v gojišču ART ob koncu gojenja, so raziskave pokazale, da lahko živi v razmerah visoke slanosti, poleg tega pa je sposobna razgrajevati fenol (Bastos in sod., 2000). Za ta organizem torej ni nenavadno, da se je uspešno razmnoževal v gojišču z dodatkom NaCl. Nekatere od gliv, ki smo jih določili kot

sorodnike glivnih solinskih predstavnikov v bogatitvah (*Candida parapsilopsis*, *C. tropicalis*, *Coniothyrium sp.*, *Phoma sp.*), je že Bridge Cooke (1970) določil v raziskavi kot predstavnike aktivnega blata v čistilni napravi.

Po TTGE analizi bakterijskih združb v bogatitvah z **organizmi aktivnega blata** smo ugotovili, da so si profili prvih vzorčenj med seboj zelo podobni, hkrati pa so podobni profilu združenega izhodnega vzorca (Slika 12). Iz tega lahko sklepamo, da se združba v bogatitvah do prvega vzorčenja ni bistveno spremenila (vsaj ena izrazita lisa, ki je že v izhodnem vzorcu najbolj izrazita, se pojavi tudi v vseh profilih združb iz prvih vzorčenj). Ob drugem vzorčenju profili združb niso več kazali medsebojne podobnosti, kar pomeni, da je razvoj združbe potekal različno v različnih bogatitvah. Iz medsebojne podobnosti profilov prvih vzorčenj (tudi med bogatitvami z vcepki različnih izhodnih vzorcev) bi lahko sklepali, da sta si tudi oba izhodna vzorca podobna med seboj. V vseh bogatitvah se je vrstna sestava združb spremenila med prvim in drugim vzorčenjem, torej v treh tednih (Slika 12). Glede na velika nihanja v optični gostoti v bogatitvah (Slika 8) pa lahko sklepamo, da to še ni optimalno stanje združbe. Bolje bi lahko ocenili potek spreminjanja sestave združbe, če bi gojenje organizmov aktivnega blata in vzorčenje potekalo dlje in bi lahko opazovali optično gostoto in TTGE profil v naslednjih vzorčenjih.

Po določitvi pripadnosti DNA izbranih lis v bakterijsko sorodstvo (Tabela 6), smo ugotovili, da se je v dveh bogatitvah (1 R2A in 1 ART) ob spremembi strukture združbe pojavila lisa, ki kaže pripadnost rodu *Aeromonas*. Bakterije iz tega rodu so sposobne preživeti ob visoki koncentraciji NaCl v okolju, v gojiščih z dodanim kvasnim ekstraktom (npr. R2A) pa je njihova sposobnost preživetja slanih razmer še večja (Delamare in sod., 2003). *Pseudomonas stutzeri* je organizem, ki je pogosto izoliran iz morskih okolij in se uspešno razmnožuje v bogatih gojiščih (Joux in sod., 1999), zato nas tudi njegovo uspešno razmnoževanje v bogatitvi ne preseneča. Poleg tega Margesin in Schinner (2001) opisujeta uporabnost tega rodu in rodu *Halomonas* za pridobivanje halofilnih encimov. Tudi *Shewanella baltica* in *Vibrio pomeroyi* sta prisotna v morju v združbah biofilmov (Lee in sod., 2003), zato jima prisotnost soli ne predstavlja prevelike ovire. *Alishewanella fetalis* je tudi opisana kot halotoleranten organizem, ki lahko živi pri do 8-odstotni koncentraciji NaCl, za njeno rast celo mora biti prisotna sol (Fonnesbech Vogel in sod., 2000). Prisotnost organizmov, ki so vsi halotolerantni in nekateri celo značilni za morsko okolje nam mogoče lahko pojasni dejstvo, da vcepek blata prihaja s čistilne naprave v Kopru, kjer morska voda občasno vdre v kanalizacijski sistem in s seboj prinese nekaj teh organizmov. V ugodnih razmerah, kakršne so bile v gojiščih z 1,5 odstotka NaCl pa so se lahko te bakterije razmnoževale in postale vodilne v združbah.

Za glivne združbe (Slika 15) v bogatitvah organizmov aktivnega blata lahko rečemo, da se niso bistveno spremenile v času gojenja, drastičnih sprememb pa ni bilo niti med profilom združenih izhodnih vzorcev in profili iz bogatitev. Glivam je torej okolje v gojišču pomenilo podobne razmere kot okolje v čistilni napravi, ali pa je potrebna, v primerjavi z

bakterijskimi združbami, večja sprememba razmer, da se struktura glivne združbe spremeni. Iz tega bi lahko sklepali, da imajo glivni organizmi v združbi tega aktivnega blata večji razpon tolerance razmer kot bakterijski.

DNA dveh izbranih lis smo uvrstili v sorodstvo primitivnih glivnih organizmov iz debla Neocallimastigomycota. Predstavnikov tega debla med glivami iz solinskih vcepkov ni bilo. Najbolj dominantna glivna organizma v vseh združbah sta bila uvrščena v rod kvasovk *Saccharomyces*, iz združb drugih vzorčenj pa smo določili njemu soroden rod *Candida*, katerega predstavnike (*C. paraprilopsis*, *C. tropicalis*) so že v preteklih raziskavah določili kot predstavnike združbe aktivnega blata (Bridge Cooke, 1970). Poleg tega rodu smo v bogatitvah določili še nekaj zaprtotrosovnic (*Phoma* sp., *Coniothyrium* sp.) in drugih sorodnikov (Tabela 8). Žal so baze podatkov za sorodnike glivnih nukleotidnih zaporedij še zelo nepopolne, zato je iskanje najbližjih sorodnikov določenega nukleotidnega zaporedja med množico tistih, ki jih ponudi internetna baza, lahko zelo nenatančno. Za zdaj žal ni boljše možnosti za uvrščanje glivnih nukleotidnih zaporedij v sorodstvo, zato se je potrebno zadovoljiti s tem. Glede na razpršeno podajanje sorodnikov pa tem bazam ne gre popolnoma zaupati. Za natančnejšo določitev gliv je potrebno upoštevati različne gene in ne le gena za 18S rRNA. Žal v naši raziskavi nismo imeli materialnih možnosti, da bi glive uvrščali v sorodstvo na podlagi več genov.

Dejavnik, ki lahko vpliva na oceno prisotnosti nekega taksona v združbi, ko sestavo združbe ocenjujemo glede na TTGE profil, je lahko že sama koncentracija DNA določenega taksona glede na koncentracijo celokupne DNA. Lahko z metodo TTGE ne zaznamo prisotnosti vrste v združbi, če je njena koncentracija DNA nizka ali, če je koncentracije DNA drugih vrst previsoka, oziroma celokupne DNA. Nekatere raziskave dopuščajo možnost, da je limitirajoč dejavnik TTGE zaznavnosti večja konkurenčnost, zaradi količine DNA dominantnih vrst ali boljše vezave oligonukleotidnih začetnikov v reakciji PCR (Ogier in sod., 2002). Ker je PCR temelj za TTGE profiliranje na podlagi pomnoženih 16S rDNA in 18S rDNA, je rezultat lahko odvisen od dogajanj v procesu pomnoževanja.

Težave pri uvrščanju v sorodstvo pa so lahko tudi posledica nepopolne ločitve fragmentov na poliakrilamidnem gelu z metodo TTGE. Rezultat take nepopolne ločitve je prekrivanje nukleotidnih zaporedij različnih organizmov v isti lisi. Ko iz take lise naredimo ekstrakcijo DNA, dobimo pravzaprav DNA več organizmov, ki jo nato s PCR pomnožimo in pošljemo na določanje nukleotidnega zaporedja. Earl in sod. (2005) so primerjali rezultate različnih polimeraz v metodi PCR, ki ji sledi TTGE. Ugotovili so, da je za dobre rezultate metode TTGE najbolj primerna uporaba polimeraze s kontrolnim branjem (proofreading), saj to prepreči pojavljanje lis na nepravih mestih v profilu TTGE.

5.1.2 Preizkus vcepka solinskih organizmov

Rezultati raziskave, ki smo jih dobili po gojenju mikroorganizmov iz solin in mikroorganizmov aktivnega blata v gojiščih so nam pokazali, da se je solinska združba ustalila v gojišču z 1,5-odstotka NaCl. Z merjenjem OG smo namreč ugotovili, da so nihanja v številu organizmov s časom bogatenja upadla. Tudi z drugimi raziskavami so dobili podatke o uporabi solinskih oziroma halofilnih organizmov kot možnosti za izboljšanje učinkovitosti čiščenja slane odpadne vode, v primerjavi z uporabo organizmov aktivnega blata, tudi če so le-ti že dlje časa gojeni v slanih razmerah (Uygur in Kargi, 2004). Odločili smo se za preizkus solinskih organizmov v modelih čistilnih naprav (MČN).

Z uporabo solinskih organizmov v modelih smo poskušali ugotoviti, če je potrebno predhodno prilagajanje organizmov iz solin na razmere slane odpadne vode, ali je vcepek organizmov iz okolja enako učinkovit.

Izkazalo se je, da vcepek iz okolja ni enako učinkovit. Za boljše odstranjevanje organskih snovi je potrebno predhodno gojenje organizmov v razmerah, ki ustrezajo slani odpadni vodi.

Čeprav je znano, da je biološko čiščenje z ogljikom, dušikom in fosforjem obremenjene vode izvedljivo tudi pri visokih koncentracijah NaCl, je za dober rezultat potrebna na take razmere prilagojena biomasa ali pa uporaba halofilnih organizmov. Problematične so predvsem razmere ko se hitro spreminja slanost in hkrati z njo tudi količina organskih snovi. Posledica tega je navadno zmanjšano odstranjevanje organskih snovi. Tudi s prilagoditvijo združbe aktivnega blata na slane razmere v odpadni vodi je čiščenje omejeno na zelo nizke koncentracije soli, zato se uporaba halofilnih organizmov navadno izkaže za najboljšo možnost za večjo učinkovitost čiščenja slane odpadne vode (Lefebvre in Moletta, 2006).

5.1.2.1 Spremembe števila mikroorganizmov v modelih in učinkovitost čiščenja

Meritve **optične gostote** (OG) (Slika 16) so pokazale, da je v MČN IN3, z zelo slanimi razmerami (17 odstotkov NaCl), številčnost mikroorganizmov najvišja. To je lahko posledica tega, da so solinski organizmi, ki so bili pred prenosom v MČN v kristalizacijskih bazenih solin še vedno zelo dobro prilagojeni na ekstremno slane razmere, v katerih se tudi uspešno razmnožujejo. Če primerjamo rezultate MČN IN3 z rezultati iz MČN IN2, kamor so bili vcepljeni enaki organizmi, je očitno, da solinskim organizmom iz okolja razmere višje slanosti bolj ustrezajo.

V MČN IN2 smo zabeležili celo zelo velik padec OG med 11. in 25. Julijem. Vrednosti so bile celo nižje od kontrolnih, prisotno je bilo tudi veliko nihanje OG skozi čas merjenja.

Rezultat testa BPK_5 (Tabeli 9 in 10, slika 17) pa nam je pokazal, da je učinkovitost čiščenja odpadne vode v tem modelu najbolj padla med prvim in drugim merjenjem.

V modelu IN1, ki je imel vcepljene združene organizme iz bogatitev, ni bilo velikih nihanj v izmerjeni OG, kar pomeni, da je združba dobro prilagojena na razmere in ne prihaja do velikih namnožitev celic in kasnejših odmiranj, ki bi vodila v sproščanje novih organskih snovi. Posledica take ustaljenosti je dobro delovanje združbe v procesih razgrajevanja organskih snovi. Ta prilagojena združba mikroorganizmov je lahko že kmalu začela oblikovati kosme in biofilme, ki so najbolj učinkovita oblika za odstranjevanje organskih snovi, saj njenega razmnoževanja ni omejevalo okolje, na katerega ne bi bila prilagojena. Biofilme smo lahko tudi opazili v modelu. Rezultat testa BPK_5 (Tabeli 9 in 10) pa nam tudi dokazuje, da je združba v modelu IN1 najbolj učinkovito odstranjevala snovi.

BPK_5 test nam namreč pove, kakšna je potreba mikroorganizmov, ki razgrajujejo organske snovi, po kisiku za oksidacijo teh organskih snovi. Več kot je prisotnih razgradljivih organskih snovi v vodi, večja je potreba po kisiku za oksidacijo le-te. Če merimo porabo kisika na vtoku in iztoku iz MČN in rezultate primerjamo, lahko izračunamo, kakšna je učinkovitost čiščenja. Če primerjamo rezultate testa BPK_5 z izmerjeno OG, lahko vidimo, da višja OG ne pomeni večje učinkovitosti organizmov pri čiščenju odpadne vode. Za primer lahko vzamemo čistilne naprave, kamor vdre slana voda. OG se poveča, ker se zaradi vpliva soli zmanjša kosmičenje, in to ima za posledico več posameznih organizmov, ki se ne usedajo. V tem primeru se zmanjša tudi odstranjevanje organskih snovi, ker so kosmi, v katere so združeni različni organizmi, bolj učinkoviti pri odstranjevanju organskih snovi, kot posamezni organizmi. Tudi v tej raziskavi je bila v modelu z najvišjo izmerjeno OG (IN3) učinkovitost čiščenja najmanjša. Vendar se je v tem modelu učinkovitost čiščenja v drugem merjenju povečala, medtem, ko se je v ostalih modelih zmanjšala (Slika 17). To bi lahko pomenilo, da so solinski organizmi v gojišču z zelo slanimi razmerami dobro uspevali in se razmnoževali, vendar združba na začetku še ni bila oblikovana tako, da bi izkoriščala veliko količino organskih snovi (tudi kosmi se še niso oblikovali), na katero ni bila prilagojena, ni pa je ovirala pri razmnoževanju. Postopno pa se je prilagajala na višek hranil in jih začela tudi izkoriščati ter odstranjevati iz gojišča. OG v MČN IN3 na koncu pada, kar je lahko posledica specializacije združbe za izkoriščanje hranil in zmanjšanja števila mikroorganizmov. Razlaga za zmanjševanje OG je lahko tudi oblikovanje kosmov in njihovo usedanje.

Iz modela brez vcepljenih mikroorganizmov (C0), ki je služil za kontrolo in preverjanje morebitnega prilagajanja mikroorganizmov, ki pridejo v čistilno napravo iz zraka in vode, na slane razmere smo dobili rezultate, ki kažejo, da se združba ni prilagodila na sol v gojišču in ni začela bolje izkoriščati hranil v slanih razmerah.

Glede na to, da je bil delež soli v MČN IN2 enak kot v MČN IN1, razlika pa je bila v tem, da smo v IN1 vcepili solinske organizme, ki pa so bili predhodno, v bolj kontroliranih razmerah, prilagojeni na tako sestavo gojišča, je za uporabo, torej čiščenje odpadne vode z

1,5-odstotno slanostjo, smiselno predhodno gojiti solinske organizme in jih vcepiti v čistilno napravo, ko je združba že stabilna v novih razmerah. Tako lahko takoj učinkovito odstranjuje organske snovi iz odpadne vode.

Glede na to, da naj bi bile razmere na vtoku v MČN v obeh merjenjih enake, ker je bila obakrat enaka sestava gojišča, je zanimivo, da so vrednosti na vtoku, ob drugem merjenju, precej nižje. Možno je, da je prišlo do napake v postopku merjenja, ali pa je bilo v drugem merjenju gojišče, ki je teklo v MČN, manj sveže. V tem primeru so lahko bakterije, ki so bile prisotne v vodi, s katero je bilo razredčeno gojišče, že porabile del organskih snovi in je zato vrednost BPK_5 nižja. Če kot vrednost testa BPK_5 na vtoku vzamemo povprečje obeh meritev, je še vedno najbolj učinkovita združba v MČN IN1, kamor smo vcepili organizme, prilagojene na razmere v modelu. Absolutne vrednosti BPK_5 na iztoku iz modelov nam tudi pokažejo, da je ob drugem merjenju v modelu IN1 vsebnost organskih snovi na iztoku najmanjša.

Iz vseh teh rezultatov torej lahko povzamemo, da je prilagoditev združbe solinskih mikroorganizmov na razmere slane odpadne vode pravi način za pripravo vcepka mikroorganizmov, ki so sposobni učinkovito odstranjevati organske snovi iz odpadne vode s povišano slanostjo.

5.1.2.2 Spreminjanje strukture združb in glavni predstavniki

V TTGE profilu bakterijske združbe (Slika 18) iz modela IN3 lahko opazimo, da je v vmesnem, drugem, vzorčenju pestrost združbe zelo velika, kasneje pa nekaj lis zbledi. Če bi se to dogajalo še naprej (žal nimamo podatkov), bi nam lahko TTGE profil potrdil specializacijo združbe v tem modelu.

Gojišč, ki so tekla v MČN, nismo sterilizirali v avtoklavu, uporabljena sol pa je bila iz Sečoveljskih solin. Tako smo lahko tudi s tem vnesli nekatere solinske mikroorganizme. Prisotnost bakterije *Halomonas sp.* v kontrolnem modelu (C0) si lahko pojasnimo prav s tem. Kljub prisotnosti bakterijske vrste tega halofilnega rodu v zadnjem vzorčenju, se je združba precej slabo odrezala pri odstranjevanju hranil iz slane odpadne vode. Lahko pa iz prisotnosti tega organizma sklepamo, da so razmere v slanem gojišču bolj ustrezale halofilnim bakterijam, ki so se tu uspešno razmnoževale, kot pa katerikoli bakterijski vrsti, ki smo jo z vodo, ki ni bila sterilna, vnesli v model. Žal je ekstrakcija ali kasnejše pomnoževanje s PCR, za DNA iz ostalih treh lis, dalo slabše rezultate, kot bi bili potrebni za pridobitev kvalitetnega nukleotidnega zaporedja in uvrstitev v sorodstvo. Za DNA iz izbrane lise v združbi modela IN2 (Slika 18) je bil rezultat po PCR premajhna količina DNA, rezultata določanja nukleotidnih zaporedij ostalih dveh lis (4.2 in 4.4, Slika 18) pa sta pokazala prekrivanje vsaj dveh različnih DNA verig v posamezni lisi. Torej sta fragmenta 16S rDNA vsaj dveh organizmov potovala na lokacijo lise, ki smo jo v

posameznem modelu izbrali za uvrstitev v sorodstvo. Tudi stopnja sorodnosti z bakterijskimi organizmi (Tabela 11), ki smo jih našli v bazah podatkov, kaže na nezanesljivost rezultata uvrstitve v sorodstvo. Žal je z metodo TTGE nemogoče ločiti DNA vseh organizmov v posamezne lise, zato prihaja do takih prekrivanj. V takih primerih je rezultat potrebno jemati z manjšo stopnjo zaupanja.

Nukleotidna zaporedja 18S rDNA, ki smo jih dobili iz lis profilov glivnih združb v modelih, so bila bolj kvalitetna od bakterijskih, vendar je pri uvrščanju glivnih nukleotidnih zaporedij v sorodstvo problematična predvsem dostopnost informacij v podatkovnih bazah nukleotidnih zaporedij. To za nukleotidna zaporedja gena za 18S rRNA ugotavljajo tudi Anderson in sod., (2003). Zato je uvrstitev v sorodstvo (Tabela 12) lahko na koncu precej subjektivno odločanje o izbranih sorodnikih, saj je iz dostopnih podatkov za večino zaporedij nemogoče objektivno z gotovostjo potrditi le nekaj najbližjih sorodnikov.

5.2 Sklepi

Glede na optično gostoto, je za rast in razmnoževanje hitrorastočih mikroorganizmov (tako solinskih kot tistih iz aktivnega blata) bolj ugodno gojišče R2A, ki je bolj bogato z organskimi snovmi.

Združba solinskih mikroorganizmov ima predstavnike, ki so sposobni rasti pri nizki koncentraciji NaCl.

Nekateri predstavniki združbe aktivnega blata so sposobni živeti in se razmnoževati v slanih razmerah.

Združba predhodno gojenih solinskih organizmov kaže v modelu čistilne naprave stabilnost v številu organizmov in najbolj učinkovito odstranjuje organske snovi iz odpadne vode.

Solinskim organizmom iz okolja bolj ustrezajo razmere povišane slanosti za hitro rast populacije. Odstranjevanje organskih snovi pa je s takimi vcepki slabše, kot z vcepki solinskih mikroorganizmov iz bogatitev, ki kažejo bistveno višjo učinkovitost čiščenja.

Višje število prostih mikroorganizmov v modelu čistilne naprave ne pomeni učinkovitejšega odstranjevanja organskih snovi.

V vzorcih, ki smo jih analizirali z metodo TTGE, so imele bakterijske združbe v večini primerov večjo vrstno pestrost kot glivne združbe, če sklepamo iz podatkov, ki jih lahko dobimo z uporabljenimi metodami.

Glivne združbe v bogatitvah solinskih mikroorganizmov in v modelih kažejo večjo konstantnost strukture združbe (glede na TTGE profile) tekom vzorčenja, kot bakterijske.

Glivne združbe aktivnega blata v slanih bogatitvah kažejo manj sprememb v sestavi združbe, kot bakterijske združbe aktivnega blata v bogatitvah.

V primerih povišanja slanosti v biološki čistilni napravi, je potrebno, za nemoteno delovanje čistilne naprave ali za minimalna odstopanja od normalnega delovanja, pripraviti vcepek predhodno prilagojenih organizmov. Glede na rezultate raziskave, predlagamo, da se za izhodiščne organizme vzame organizme iz ekstremno slanega okolja. Le-te bogatimo v gojišču, ki ustreza razmeram v slani odpadni vodi. Za vzdrževanje števila organizmov in za nemoten razvoj združbe, dodajamo sveže gojišče v nekajdnevni presledki. Po podatkih naše raziskave se struktura večine solinskih združb v bogatitvah spremeni po približno dveh tednih. Za uporabo v biološki čistilni napravi pa priporočamo, da se čas bogatenja, pred uporabo takih organizmov, podaljša na približno 6 tednov, ko že dominirajo taksoni, ki so ob spremembi strukture združbe postali zaznavni z metodo TTGE. Taki organizmi bodo v čistilni napravi ob nastanku razmer povišane slanosti, učinkovito opravljali razgradnjo organskih snovi.

V končnih združbah bogatitev solinskih organizmov so bili v večini primerov dominantni halofilni organizmi, v končnih združbah bogatitev organizmov aktivnega blata pa so dominirali organizmi, ki so se sposobni prilagoditi na 1,5-odstotno slanost, rastejo pa lahko tudi v razmerah brez soli (halotolerantni organizmi).

6 POVZETEK

Čiščenje odpadne vode v bioloških čistilnih napravah temelji na razgradnji organskih snovi s pomočjo mikroorganizmov aktivnega blata, ki te snovi predelajo v različne produkte in lastno biomaso. S tem jih, v optimalnih razmerah, večino odstranijo iz odpadne vode. Če razmere v čistilni napravi postanejo stresne za mikroorganizme, na primer ob nenadnem povišanju koncentracije NaCl, se učinkovitost razgradnje organskih snovi zelo zmanjša, ker se mora večina mikroorganizmov spopadati z ozmotskimi spremembami in preživetjem le-teh. Veliko organizmov, ki se ne morejo prilagoditi, propade. Vdor slane vode vpliva negativno tudi na kosmičenje neprilagojenih mikroorganizmov, kar ima za posledico manjšo učinkovitost čiščenja, saj v kosme združeni mikroorganizmi bolj uspešno opravljajo čiščenje odpadne vode. Mikroorganizmom iz slanih okolij je prisotnost NaCl dejavnik, ki je del optimalnih razmer za njihovo življenje in razmnoževanje. V solinah so mikroorganizmi prilagojeni na velika nihanja koncentracije soli, saj se le-ta skozi leto zelo spreminja. V raziskavi tega diplomskega dela smo preizkušali možnosti uporabe takih mikroorganizmov za pripravo vcepka, ki ga v primeru povišanja koncentracije NaCl vnesemo v biološko čistilno napravo in s tem preprečimo upad odstranjevanja organskih snovi.

V prvem delu raziskave smo nastavili bogatitve z vcepki koncentrirane vode iz kristalizacijskih bazenov Sečoveljskih solin in bogatitve z vcepki koncentriranega aktivnega blata iz koprške čistilne naprave. Iz vseh bogatitev smo vzorčili v nekajdnevnikih presledkih, pri čemer smo izmerili optično gostoto bogatitev za vpogled v rast populacije, koncentrirane vzorce pa smo shranili za kasnejšo molekularno analizo.

Na Oddelku za vodarstvo Fakultete za gradbeništvo in geodezijo smo pripravili štiri pomanjšane modele čistilnih naprav, v katere je teklo gojišče, ki ustreza umetni slani odpadni vodi. V tri modele je teklo gojišče z 1,5-odstotno koncentracijo NaCl. Eden od modelov je bil brez vcepka in je predstavljal kontrolo. V drugega smo vcepili solinske organizme, ki smo jih pred tem bogatili v enakem gojišču, kot je teklo v model, v tretjega pa solinske organizme, ki jih nismo predhodno bogatili. V četrti model je teklo gojišče s 17-odstotno koncentracijo NaCl. Vanj smo, tako kot v tretji model, vcepili solinske organizme, ki niso bili predhodno prilagojeni na razmere v gojišču. Tedensko smo merili optično gostoto (rast populacij) in shranjevali vzorce za nadaljnjo analizo. S testom BPK_5 smo izmerili učinkovitost odstranjevanja organskih snovi v posameznem modelu.

Za vpogled v spreminjanje strukture bakterijskih in glivnih združb v bogatitvah in v modelih čistilnih naprav, smo iz izbranih shranjenih vzorcev izolirali DNA in z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pomnožili dele genov za 16S rRNA in 18S rRNA, na podlagi katerih smo, z metodo gelske elektroforeze s časovno določenim temperaturnim gradientom (TTGE), dobili podatke o spremembah v vrstni strukturi združb tekom bogatenja. Iz gelov, ki so vsebovali 16S rDNA (pri analizi bakterijskih združb) in 18S rDNA (pri analizi glivnih združb), smo izrezali vidne lise s fragmenti DNA. Iz izbranih lis

s fragmenti DNA organizmov, za katere smo ocenili, da so v času bogatitve ali v času prisotnosti v modelu postali dominantni v združbi, smo DNA ponovno pomnožili s PCR in jo poslali na določanje nukleotidnega zaporedja. S temi podatki smo organizmom lahko določili filogenetsko pripadnost.

TTGE profili združb so pokazali, da se je v času 2 do 3 tednov večina združb spremenila glede dominantnih organizmov, katerih prisotnost je z nadaljnjimi vzorčenji vedno bolj opazna. Vrstna struktura bakterijskih združb se je, v primerjavi z glivnimi, bolj spremenila. Pomemben podatek, ki smo ga dobili z raziskavo, je učinkovitost odstranjevanja organskih snovi v modelu čistilne naprave z vcepkom vnaprej prilagojenih solinskih organizmov, v primerjavi z ostalimi modeli. Ugotovili smo, da je učinkovitost tega modela v obeh merjenjih najvišja, hkrati pa je to edini model, kjer učinkovitost ni bila nikoli manj kot 90-odstotna.

Med bakterijami iz solinske združbe, ki so postale dominantne v bogatitvah, smo določili sorodnike rodov *Marinobacter*, *Halomonas* in *Idiomarina*, v bogatitvah organizmov aktivnega blata pa so se najbolj uspešno razmnoževali predstavniki rodov *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Alishewanella*, *Vibrio* in *Shewanella*.

Med solinskimi glivnimi predstavniki iz bogatitev smo določili sorodnike rodov *Saccharomyces*, *Candida*, *Didymella*, *Phoma*, *Acremonium*, *Coniothyrium* in nekaterih drugih. Sorodniki rodov *Saccharomyces* in *Candida* so se uspešno razmnoževali tudi v bogatitvi organizmov aktivnega blata. Poleg njih pa tudi pripadniki sorodstva rodov nekaterih drugih zaprtotrosov in pripadniki družine primitivnih organizmov *Neocallimastigaceae*.

V modelih čistilnih naprav smo med bakterijami lahko določili sorodnike rodov *Halomonas*, *Acinetobacter* in *Comamonas*, med glivnimi predstavniki pa so bili v modelih uspešni sorodniki rodov *Aureobasidium*, *Kabatiella*, *Phaeosphaeria*, *Didymella*, *Phoma*, *Dimorphospora* in *Helicodendron*.

Prilagajanje združbe organizmov, ki izhajajo iz neslanih okolij, na razmere povišane slanosti je mogoče le, če so v združbi tudi halotolerantni organizmi, ki v slanih razmerah postanejo dominantni. Vendar lahko traja zelo dolgo, da postane taka združba dovolj stabilna za izkoriščanje snovi v okolju in jo lahko uporabimo za čiščenje odpadne vode.

Za pripravo vcepka, ki bi v primeru povišane slanosti v čistilnih napravah pripomogel k normalnemu delovanju čistilne naprave, je potrebno izhodno združbo iskati v okoljih, ki imajo velika nihanja koncentracije soli. Tako okolje so tudi soline. Za organizme iz solin se je izkazalo, da so se sposobni hitro prilagoditi na razmere v umetni slani odpadni vodi, ker jim prisotnost soli pomeni dejavnik, ki ga celo potrebujejo za svojo rast. Na razmere v slani odpadni vodi prilagojeni solinski organizmi se lahko hitro začnejo združevati v kosme in biofilme, s čimer se poveča učinkovitost odstranjevanja organskih snovi.

7 VIRI

- Anderson, I.C., Campbell, C.D., Prosser, J.I. 2003. Potential bias of fungal 18S and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*, 5, 1: 36-47.
- Antón, J., Rosselló-Mora, R., Rodríguez-Valera, F., Amann, R. 2000. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 3052-3057.
- Bastos, A.E., Moon, D.H., Rossi, A., Trevors, J.T., Tsai, S. M. 2000. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archives of Microbiology*, 174: 346-352.
- Böckmann, R.A., Hac, A., Heimburg, T., Grubmüller, H. 2003. Effect of sodium chloride on a lipid bilayer. *Biophysical Journal*, 85: 1647-1655.
- Bourquin, A.W. 1977. Degradation of malathion by salt-marsh microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 2: 356-362.
- Bratož, I. (2. november 2007). Sol osebno. Delo: 17.
- Bridge Cooke, W. 1970. Fungi associated with the activated-sludge process of sewage-treatment plant. *The Ohio Journal of Science*, 70: 129-146.
- Butinar, L., Sonjak, S., Zalar, P., Plemenitaš, A., Gunde-Cimerman, N. 2005. Melanized halophilic fungi are eukaryotic members of microbial communities in hypersaline waters of solar salterns. *Botanica Marina*, 48: 73-79.
- Campos, J.L., Mosquera-Corral, A., Sánchez, M., Méndez, R., & Lema, J.M. 2002. Nitrification in saline wastewater with high ammonia concentration in an activated sludge unit. *Water Research*, 36: 2555-2560.
- Cochran, P.K., Kellogg, C.A., Paul, J.H. 1998. Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants. *Marine Ecology Progress Series*, 164: 125-133.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Bandela, A.M., Cardenas, E., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. 2007. The ribosomal database project (RDP-II) Pridobljeno iz: <http://rdp.cme.msu.edu/>
- Cornejo, P., Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., Ferrol, N. 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 241: 265-270.

- Daims, H., Taylor, M.W., Wagner, M. 2006. Wastewater treatment: a model system for microbial ecology. *TRENDS in Biotechnology*, 24, 11: 483-489.
- Delamare, A.P., Dalcin, T., Müller, G., Pinto da Costa, S.O., Echeverrigaray, S. 2003. The effect of organic osmoprotectants on *Aeromonas trota* and *A. hydrophila* grown under high sodium chloride concentrations. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34: 128-130.
- Department of Bacteriology. 2007. Nutrition and growth of bacteria. Pridobljeno iz Todar's Online Textbook of Bacteriology:
<http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro.html>
- Dinçer, A.R., Kargi, F. 2001. Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 28: 661-665.
- Dyall-Smith, M., Danson, M. 2001. The life of brine: halophiles in 2001. International conference on halophilic microorganisms, Sevilla, Španija, 2001, *Genome Biology*: 23-27
- Earl, J., Pickup, R.W., Ritchie, D.A., Edwards, C. 2005. Development of temporal temperature gradient electrophoresis for characterising methanogen diversity. *Microbial Ecology*, 50: 327-336.
- Fonnesbech Vogel, B., Venkateswaran, K., Christensen, H., Falsen, E., Christiansen, G., Gram, L. 2000. Polyphasic taxonomic approach in the description of *Alishewanella fetalis* gen. nov., sp. nov., isolated from a human foetus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 1133-1142.
- Gabor, E.M., de Vries, E.J., Janssen, D.B. 2003. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbial Ecology*, 44: 153-163.
- Gilbride, K.A., Lee, D.Y., Beaudette, L.A. 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 1-20.
- Goddard, M. R., & Bradford, M. A. (2003). The adaptive response of a natural microbial population to carbon- and nitrogen-limitation. *Ecology Letters*, 6, 594-598.
- Grimalt, J.O., de Wit, R., Teixidor, P., Albaiges, J. 1992. Lipid biogeochemistry of *Phormidium* and *Microcoleus* mats. *Advances in organic chemistry*. 19: 509-530.
- Gunde-Cimerman, N., Sonjak, S., Zalar, P., Frisvad, J.C., Diderichsen, B., Plemenitaš, A. 2003. Extremophilic fungi in arctic ice: a relationship between adaptation to low temperature and water activity. *Physics and Chemistry of the Earth*, 28: 1273-1278.

- Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., Plemenitaš, A. 2000. Hypersaline waters in salterns. *FEMS Microbiology Ecology*, 32: 235-240.
- Hinteregger, C., Streichsbier, F. 1997. *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. *Biotechnology Letters*, 19, 11: 1099-1102.
- Jeršek, M., Jeršek, B. 2008. PMS: Mineralogija - Človek in sol. Pridobljeno iz: Prirodoslovni muzej Slovenije: <http://www2.pms-lj.si/oddelki/mineralogija/sol.html>
- Jones, W.J., Nagle, N.J., Whitman, W.B. 1987. Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbiological Reviews*, 51, 1: 135-177.
- Joux, F., Jeffrey, W.H., Lebaron, P., Mitchell, D.L. 1999. Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 9: 3820-3827.
- Kargi, F., Dinçer, A.R. 1998. Saline wastewater treatment by halophile-supplemented activated sludge culture in an aerated rotating biodisc contractor. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 427-433.
- Kieft, T.L., Soroker, E., Firestone, M.K. 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biology & Biochemistry*, 19, 2: 119-126.
- Kosjek, T., Heath, E., Kompare, B. 2007. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1379-1387.
- Križan, B., Vidmar, B. 2004. Krajinski park Sečoveljske soline. Pridobljeno iz: Nature parks of Slovenian Istra: <http://dragonja.nib.si/Secovlje/indexS.html>
- Kubo, M., Hiroe, J., Murakami, M., Fukami, H., Tachiki, T. 2001. Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 2: 222-224.
- Kurita, N., Koike, S. 1982. Synergistic antimicrobial effect of sodium chloride and essential oil components. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 1: 159-165.
- Kurz, M., Brünig, A.N., Galinski, E.A. 2006. NhaD type sodium/proton-antiporter of *Halomonas elongata*: a salt stress response mechanism in marine habitats? Pridobljeno iz: <http://www.salinesystems.org/content/2/1/10>
- Lapanje, A. 2005. Vpliv onesnaženosti z živim srebrom na vrstno raznolikost bakterij v prebavilih enakonožnih rakov. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana.

- Lee, Y.K., Kwon, K.K., Cho, K.H., Kim, H.W., Park, J.H., Lee, H.K. 2003. Culture and identification of bacteria from marine biofilms. *The Journal of Microbiology*, 41, 3: 183-188.
- Lefebvre, O., Moletta, R. 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: A literature review. *Water research*, 40: 3671-3682.
- Lefebvre, O., Quentin, S., Torrijos, M., Godon, J.J., Delgenès, J.P., Moletta, R. 2007. Impact of increasing NaCl concentrations on the performance and community composition of two anaerobic reactors. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75: 61-69.
- Lefebvre, O., Vasudevan, N., Thanasekaran, K., Moletta, R., Godon, J.J. 2006. Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries. *Extremophiles*, 10: 505-513.
- March, J.C., Bentley, W.E. 2004. Quorum sensing and bacterial cross-talk in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 15: 495-502.
- Margesin, R., Schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5: 73-83.
- Muyzer, G., deWaal, E., Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2008. Pridobljeno iz: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., Latouche, S., Arné, P., Guillot, J. 2007. Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 86-95.
- Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., Delacroix-Buchet, A. 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8: 3691-3701.
- Oren, A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 2: 334-348.
- Oren, A. 2002. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 56-63.
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1: 1-7.

- Robert, H., Le Marrec, C., Blanco, C., Jebbar, M. 2000. Glycine betaine, carnitine, and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2: 509-517.
- Roberts, M.F. 2005. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*, 1, 1: 5
- Smit, E., Leeftang, P., Glandorf, B., van Elsas, J.D., Wernars, K. 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2614-2621.
- Sorokin, D.Y. 2007. Diversity of halophilic sulfur-oxidizing bacteria in hypersaline habitats. V: *Microbial Sulfur Metabolism*: 225-237.
- Stopar, D. 2008. Vpliv virusov na pretok energije in snovi v ekosistemu. Pridobljeno iz: Univerza v Novi Gorici: <http://www.p-ng.si/si/raziskave/cetrkov-kolokvij/2002-2003/povzetek-2003-01-09/>
- Stopar, D. 2005. Zapiski s predavanj, mikrobna ekologija. Pridobljeno iz: <http://web.bf.uni-lj.si/zt/mikro//homepage/lecturenotesME.html>
- Turk, M., Mejanelle, L., Šentjerc, M., Grimalt, J.O., Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A. 2004. Salt-induced changes in lipid composition and membrane fluidity of halophilic yeast-like melanized fungi. *Extremophiles*, 8: 53-61.
- Urbanič, G., Toman, M.J. 2003. Varstvo celinskih voda. Ljubljana: Študentska Založba.
- Uygur, A., Kargi, F. 2004. Salt inhibition on biological nutrient removal from saline wastewater in a sequencing batch reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 313-318.
- Vovk Korže, A., Vrhovšek, D. 2006. Ekoremediacije za učinkovito varovanje okolja. Maribor: Inštitut za promocijo varstva okolja.
- Wagner, M., Loy, A. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 218-227.
- Woolard, C.R., Irvine, R.L. 1994. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environment Research*, 66: 230-235.
- Yoshie, S., Noda, N., Miyano, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Inamori, Y. 2001. Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and the cultivation method. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 4: 346-353.

Zupančič, G., Drašlar, K., Stušek, P. 2002. Fiziologija živali, navodila za vaje.

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Nini Gunde-Cimerman se zahvaljujem za vse strokovne nasvete, prijaznost in pomoč pri izdelavi diplomskega dela v končni obliki.

Za strokovno izvedbo praktičnega dela raziskave je zaslužen somentor dr. Aleš Lapanje, ki mi je bil vedno na voljo z navodili, praktično pomočjo, moralno podporo in prijateljskimi nasveti. V veliko pomoč pa mi je bil tudi pri končnem oblikovanju diplomskega dela. Za vse to sem mu neizmerno hvaležna.

Recenzentki prof. dr. Ani Plemenitaš se zahvaljujem za pregled diplomskega dela in nasvete za njegovo boljšo izdelavo.

Hvala vsem s Katedre za biologijo mikroorganizmov za potrpežljivost ob mojem dolgotrajnem kratenju prostora v laboratorijih.

Brez Jernejeve podpore si ne morem predstavljati, kako bi pripeljala diplomsko delo do konca, saj mi je bil v pomoč prav na vsakem koraku. Hvala za vso moralno in materialno podporo, vožnje v Ljubljano, računalniške nasvete, spodbujanje, potrpežljivost in ljubezen.

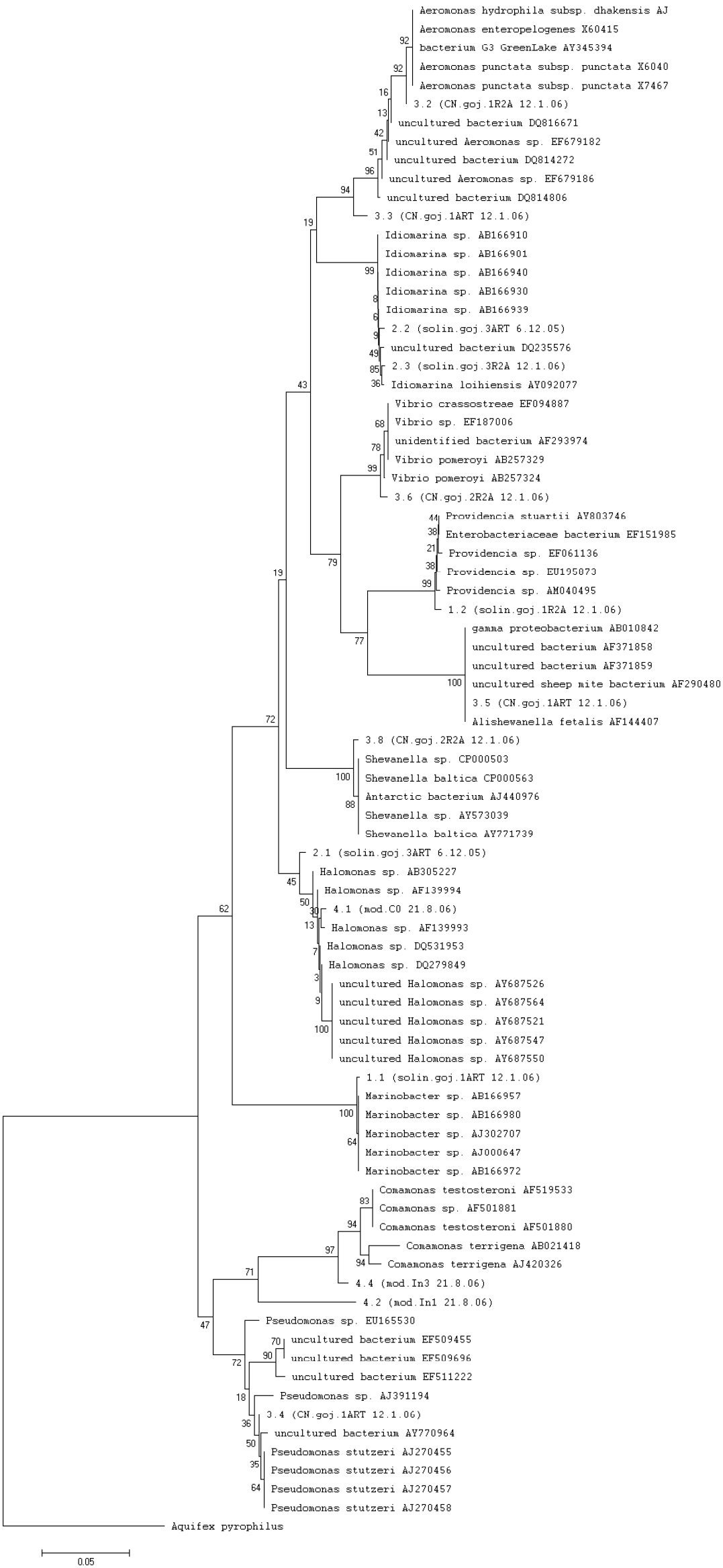
Mami hvala za potrpežljivost, spodbudne besede in topla kosila.

Zahvaljujem se tudi prijateljem, ker so vedno na voljo za sproščene debate, brez katerih ne gre. Zali pa tudi za vse nasvete ob izdelavi diplomskega dela in vso drugo podporo.

Moji mačkici Lili sem hvaležna ker je vedno vesela, ko pridem domov, in razume moje težave ter radosti.

PRILOGE

Priloga A: Bakterijsko filogenetsko drevo



Priloga B: Glavno filogenetsko drevo

