## UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja GORIŠEK

## VPLIV NONILFENOLA NA STRUKTURO MIKROBNE ZDRUŽBE V REAKTORJU S PRITRJENO BIOMASO

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

#### UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maja GORIŠEK

## VPLIV NONILFENOLA NA STRUKTURO MIKROBNE ZDRUŽBE V REAKTORJU S PRITRJENO BIOMASO

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

## THE EFFECT OF NONYLPHENOL ON THE STRUCTURE OF MICROBIAL COMMUNITY IN BIOREACTOR WITH ATTACHED BIOMASS

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo predstavlja zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti na Oddelku za zootehniko v Domžalah na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo ter v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je dne 12.12.2007 za mentorja imenovala prof. dr. Gorazda Avguština, za somentorja dr. Janeza Vrtovška, za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Mentor:	prof. dr. Gorazd Avguštin
Somentor:	dr. Janez Vrtovšek
Recenzent:	prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Ines Mandić – Mulec Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	prof. dr. Gorazd Avguštin Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član:	dr. Janez Vrtovšek Kemijski inštitut Slovenije, Laboratorij za okoljske vede in inženirstvo, Ljubljana
Član:	prof. dr. David Stopar Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Gorišek

#### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

#### ŠD Dn

- DK UDK 579.8:575.86:502.5(282.02)(043)=163.6
- KG podtalnica/modelne raztopine/nitrati/onesnaževala/nonilfenol/mikrobne združbe/bioreaktor s pritrjeno biomaso/geni za 16S rRNK/PCR/DGGE/kloniranje/ sekvenciranje/sekvenčna analiza
- AV GORIŠEK, Maja
- SA AVGUŠTIN, Gorazd (mentor), VRTOVŠEK, Janez (somentor)/STOPAR, David (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2009
- IN VPLIV NONILFENOLA NA STRUKTURO MIKROBNE ZDRUŽBE V REAKTORJU S PRITRJENO BIOMASO
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIV, 80 str., 7 pregl., 20 sl., 28 pril., 80 vir.
- IJ sl
- JI sl/en

AI Z molekularnimi metodami smo želeli ugotoviti ali in kako nonilfenol (NF) vpliva na strukturo pritrjene mikrobne združbe v pretočnem bioreaktorju, v katerem smo simulirali onesnaženje podtalnice z nitratom in nonilfenolom. Skupno mikrobno DNK iz vseh vzorcev smo izolirali z metodo z ultrasoničnim dezintegratorjem, z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) pomnožili dele genov za 16S rRNK in jih ločili s poliakrilamidno elektroforezo v gradientu denaturanta (DGGE). Na podlagi DGGE profilov smo ugotovili, da je NF vplival na strukturo mikrobne združbe tako, da jo je spremenil nato pa je ta ves čas dodajanja NF ostala enaka. Z molekularnim kloniranjem in nato sekvenčno analizo smo identificirali 19 sekvenc, ki so se pojavile v vzorcu nonilfenol 3. Sekvence smo preliminarno identificirali, jih preverili s programom Chimera Check in narisali filogenetska drevesa. Najbolj zastopani skupini sta se uvrstili med alfa in beta proteobakterije. Največji delež bakterij so predstavljale bakterije sorodne vrsti Xanthobacter flavus, tem pa so sledile bakterije sorodne vrsti Cellulomonas parahominis oz. Cellulomonas hominis. Pridobili smo še sekvence bakterij sorodnih vrstam: Ferribacterium limneticum, Rhodocyclus tenius, Propionivibrio limicola, Propionivibrio dicarboxylicus, Anaeroarcus burkinensis, bakterijam iz rodu Labrys in še negojenim spartobakterijam.

#### KEY WORD DOCUMENTATION

#### DN Dn

- DC UDC 579.8:575.86:502.5(282.02)(043)=163.6
- CX groundwater/model solutions/nitrates/pollutants/nonylphenols/microbial community/bioreactor with attached biomass/16S rRNA genes/PCR/DGGE/ molecular cloning/sequencing/ sequence analysis
- AU GORIŠEK, Maja
- AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor), VRTOVŠEK, Janez (co-advisor)/ STOPAR, David (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2009
- TI THE EFFECT OF NONYLPHENOL ON THE STRUCTURE OF MICROBIAL COMMUNITY IN BIOREACTOR WITH ATTACHED BIOMASS
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XIV, 80 p., 7 tab., 20 fig., 28 ann., 80 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The purpose of this work was to establish if and how nonylphenol (NP) affects the

structure of attached microbial community in a flow-through bioreactor utilised to simulate nitrate and NP polluted ground water system, using a molecular approach. Total microbial DNA was isolated using ultrasonication method, segments of bacterial 16S rDNA were PCR amplified and separated using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Based on resultant DGGE profiles we established that addition of NP changed the structure of attached microbial community, which stabilized after initial transition period and remained altered in the presence of NP. Using molecular cloning, DGGE clone selection, sequencing and sequence analysis we identified 19 sequences present in the sample "nonylphenol 3". Sequences were preliminarily identified, checked for chimeras using Chimera Check and phylogenetic trees were constructed. The most represented taxa were alpha- and beta-Proteobacteria, with *Xanthobacter flavus* – related sequences being the most abundant, followed by *Cellulomonas parahominis/Cellulomonas hominis* – related sequences. Sequences similar to *Ferribacterium limneticum, Rhodocyclus tenius, Propionivibrio limicola, Propionivibrio dicarboxylicus, Anaeroarcus burkinensis*, species of the genus *Labrys* and uncultured spartobacteria were also detected.

## KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key word documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VIII
	Kazalo slik	IX
	Kazalo prilog	XI
	Okrajšave in simboli	XIV
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA IN HIPOTEZE	1
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA	3
2.1.1	Nonilfenol	4
2.1.1.1	Vpliv nonilfenola na živa bitja	5
2.1.1.2	Vpliv nonilfenola na mikroorganizme	9
2.1.1.3	Mikrobna razgradnja nonilfenola	10
3	MATERIAL IN METODE	12
3.1	MATERIAL	12
3.1.1	Vzorci	12
3.1.1.1	Testna vzorca	12
3.1.1.2	Poskusni vzorci	13
3.1.2	Kompleti	14
3.1.3	Pufri in raztopine	14
3.1.4	Bakterijski sevi	15
3.2.5	Gojišča	15
3.2	METODE	16
3.2.1	Izolacija skupne mikrobne DNK	16
3.2.1.1	Izolacija skupne mikrobne DNK z MoBio kompletom	16

3.2.1.2	Izolacija skupne mikrobne DNK z metodo s krogličnim stresalcem	
	(beadbeater)	16
3.2.1.3	Izolacija skupne mikrobne DNK z metodo z ultrazvočnim	
	dezintegratorjem	17
3.2.1.4	Izolacija skupne mikrobne DNK s proteinazo K, SDS-om in fenolom	18
3.2.2	Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo	)
	s polimerazo (PCR)	18
3.2.3	Agarozna gelska elektroforeza	19
3.2.4	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem	
	gradientu (DGGE; angl. denaturing gradient gel electrophoresis)	20
3.2.5	Kloniranje	21
3.2.5.1	Priprava PCR pomnožkov za vstavljanje v plazmidni vektor	21
3.2.5.2	Ligacija in transformacija plazmidnega vektorja pGEM-T in PCR	
	pomnožkov	21
3.2.5.3	Izolacija plazmidne DNK	23
3.2.5.4	Čiščenje plazmidne DNK s fenolom in kloroformom	23
3.2.5.5	Sekvenciranje nukleinskih kislin in analiza sekvenc	24
4	REZULTATI	26
4.1	IZBIRA METODE ZA IZOLACIJO SKUPNE MIKROBNE DNK	
	IZ T.I. TESTNIH VZORCEV	26
4.1.1	Izolacija skupne mikrobne DNK iz t.i. testnih vzorcev	26
4.1.2	Ugotavljanje ustreznosti izolirane mikrobne DNK za	
	pomnoževanje ribosomskih genov z verižno reakcijo s polimerazo	27
4.2	IZOLACIJA SKUPNE MIKROBNE DNK IN POMNOŽEVANJE	
	DELA BAKTERIJSKIH GENOV ZA 16S rRNK Z VERIŽNO	
	REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)	30
4.3	POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA VZORCEV V	
	GRADIENTU DENATURANTA (DGGE)	31
4.4	KLONIRANJE	32
4.5	SEKVENCIRANJE IN SEKVENČNA ANALIZA	38
4.5.1	Hyphomicrobiaceae	43

4.5.1.1	Xanthobacter	45
4.5.1.2	Labrys	46
4.5.2	Rhodocyclaceae	47
4.5.2.1	Ferribacterium	49
4.5.2.2	Propionivibrio	49
4.5.2.3	Rhodocyclus	50
4.5.3	Xiphinematobacteriaceae	51
4.5.4	Veillonellaceae	53
4.5.5	Cellulomonadaceae	55
4.5.5.1	Cellulomonas	56
4.6	DGGE PROFIL VZORCA NONILFENOL 3	57
4.7	REZULTATI MERITEV KPK, NITRATA IN NITRITA	58
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	60
5.1	RAZPRAVA	60
5.1.1	Izbira primerne metode za izolacijo DNK in primernih zače	etnih
	oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo	60
5.1.2	Analiza eksperimentalnih vzorcev	61
5.1.2.1	Kloniranje in analiza klonov vzorca nonilfenol 3	61
5.1.2.2	Sekvenciranje in sekvenčna analiza	62
5.2	SKLEPI	67
6	POVZETEK	68
7	VIRI	70
	ZAHVALE	
	PRILOGE	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Pufri in raztopine, ter njihova sestava	14
Preglednica 2:	Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo	18
Preglednica 3:	Mešanice in protokoli za PCR reakcije	19
Preglednica 4:	Identifikacija pridobljenih sekvenc brez mest kamor nalegata začetna oligonukleotida fD1 in 1401r	39
Preglednica 5:	Povzetek rezultatov iskanja najpodobnejših sekvenc z algoritmoma FASTA 3 in Blast	41
Preglednica 6:	Povzetek iskanja najpodobnejših sekvenc z algoritmoma FASTA 3 in Blast za posamezne dele himernih sekvenc	42
Preglednica 7:	Povprečne vrednosti meritev KPK, nitrata in nitrita v času vzorčenja	59

## KAZALO SLIK

Slika 1:	4-nonilfenol	4
Slika 2:	Shema bioreaktorja	12
Slika 3:	Elektroforetska ločitev DNK izolirane iz testnih vzorcev z različnimi metodami.	26
Slika 4:	Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida GC-Eub338F in 534R) iz testnih vzorcev.	28
Slika 5:	Agarozna gelska elektroforeza PCR pomnožkov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) iz testnih vzorcev.	28
Slika 6:	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza, PCR pomnožkov (F968-GC in 1401r) DNK izolirane iz testnih vzorcev z različnimi metodami.	29
Slika 7:	Agarozna gelska elektroforeza PCR pomnožkov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) iz poskusnih vzorcev.	30
Slika 8:	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza PCR pomnožkov (F968-GC in 1401r) poskusnih vzorcev.	31
Slika 9:	A.= Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR bakterijskih ribosomskih genov vzorca nonilfenol 3, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma fD1 – 1401r. B.= Agarozna gelska elektroforeza očiščenih pomnožkov PCR vzorca nonilfenol 3, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma fD1 – 1401r	33
Slika 10:	Agarozna gelska elektroforeza PCR pomnožkov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida M13uni in M13rev) iz posameznih klonov.	34
Slika 11:	Agarozna gelska elektroforeza PCR produktov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) iz posameznih klonov.	35
Slika 12:	Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza, pomnožkov plazmidnih vključkov iz posameznih klonov in vzorca nonilfenol 3 pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma F968-GC in 1401r.	36

Slika 13:	Elektroforetska ločitev (DGGE) pomnožkov ribosomskih genov iz vzorca nonilfenol 3.	37
Slika 14:	Filogenetsko drevo za 19 pridobljenih sekvenc (neobtežena metoda parnih skupin z aritmetično skupino – UPGMA).	40
Slika 15:	Uvrstitev klonov 3, 5, 6, 14, 20, 35, 36, 38 in 42 v filogenetsko drevo družine <i>Hyphomicrobiaceae</i> s programskim paketom MEGA 4.	44
Slika 16:	Uvrstitev klonov 2b*, 16, 34 in 48 v filogenetsko drevo družine <i>Rhodocyclaceae</i> s programskim paketom MEGA 4.	48
Slika 17:	Uvrstitev klonov 8, 10a* in 21 v filogenetsko drevo družine <i>Xiphinematobacteriaceae</i> s programskim paketom MEGA 4.	52
Slika 18:	Uvrstitev klona 15b* v filogenetsko drevo družine <i>Veillonellaceae</i> s programskim paketom MEGA 4.	54
Slika 19:	Uvrstitev klona 29 v filogenetsko drevo družine <i>Cellulomonadaceae</i> s programskim paketom MEGA 4.	55
Slika 20:	DGGE profil vzorca nonilfenol 3.	57

#### KAZALO PRILOG

- **Priloge A:** Sekvence pridobljene s sekvenčno analizo klonov iz vzorca nonilfenol 3, katerim sledijo rezultati iskanja najpodobnejših sekvenc v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A1:** Sekvenca 2 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A2:** Sekvenca 3 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A3:** Sekvenca 5 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A4:** Sekvenca 6 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A5:** Sekvenca 8 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A6:** Sekvenca 9 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A7:** Sekvenca 10 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A8:** Sekvenca 14 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A9:** Sekvenca 15 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga A10:** Sekvenca 16 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - Priloga A11: Sekvenca 20 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - Priloga A12: Sekvenca 21 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - Priloga A13: Sekvenca 29 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast

- Priloga A14: Sekvenca 34 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
- Priloga A15: Sekvenca 35 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
- **Priloga A16:** Sekvenca 36 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
- **Priloga A17:** Sekvenca 38 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
- Priloga A18: Sekvenca 42 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
- Priloga A19: Sekvenca 48 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
- **Priloge B:** Preverjanje sekvenc 2, 10 in 15 s programom Chimera Check za možne himere
  - **Priloga B1:** Sekvenca 2 in možne himere. Rezultati so pridobljeni z uporabo programa Chimera Check
  - **Priloga B2:** Sekvenca 10 in možne himere. Rezultati so pridobljeni z uporabo programa Chimera Check
  - Priloga B3: Sekvenca 15 in možne himere. Rezultati so pridobljeni z uporabo programa Chimera Check
- **Priloge C:** Rezultati iskanja najpodobnejših sekvenc delom sekvenc 2, 10 in 15 v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga C1:** Sekvenca 2 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - **Priloga C2:** Sekvenca 10 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - Priloga C3: Sekvenca 15 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast

- **Priloge D:** Ročno popravljanje dolžin himernih sekvenc sekvence 15. Rezultati iskanja najpodobnejših sekvenc delom sekvence 15 v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast
  - Priloga D1: Prvi del sekvence 15; in sicer od mesta 1 do mesta 265 nukleotida
  - Priloga D2: Drugi del sekvence 15; in sicer od mesta 266 do mesta 1262 nukleotida
  - Priloga D3: Tretji del sekvence 15; in sicer od mesta 1263 do mesta 1464 nukleotida

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Alkilfenol etoksilati		
Basic Logical Alignment Search Tool (orodje za iskanje osnovnih		
logičnih poravnav nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij)		
Bazni par		
Heksadeciltrimetilamonijev bromid		
Denaturating gradient gel electrophoresis (poliakrilamidna gelska		
elektroforeza v denaturirajočem gradientu)		
European Bioinformatics Institute (Evropski inštitut za bioinformatiko)		
European Molecular Biology Laboratory (Evropski molekularno-biološki		
laboratorij)		
Orodje za primerjavo nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij		
Razmerje med kemijsko potrebo po kisiku in dušikom		
National Center for Biotechnology Information (Državni center za		
biotehnološke informacije)		
Nonilfenol etoksilati		
Nukleotid		
Pretok		
Ribosomal database project (podatki in orodja za analizo bakterijskih in		
arhejskih 16S rRNA sekvenc)		
2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol		
5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid		

#### 1 UVOD

Nonilfenol, ki ga odkrijemo v vodnem okolju je običajno produkt mikrobiološke razgradnje nonilfenol-n-etoksilatov (NPE), ki spadajo v skupino alkilfenol-n-etoksilatov (APE). NPE so obstojni organski onesnaževalci, svetlorumene oljnate tekočine brez vonja. Uporabljajo se pri proizvodnji barv, lepil, plastike, emulgatorjev, antioksidantov, detergentov, stabilizatorjev, aditivov, fungicidov, baktericidov in zdravil, torej v kemijski, farmacevtski, fitofarmacevtski industriji ipd.. Svetovna produkcija APE na leto znaša približno 600.000 ton, od tega je kar 80 odstotkov NPE. Nonilfenol je tudi endokrini motilec hormonskega sistema, ki posnema delovanje naravnega hormona estrogena. Ima afiniteto za vezavo na receptor za naravni hormon in lahko vpliva na organizme z oponašanjem naravnega hormona in tako stimulira kemijsko reakcijo v telesu, blokira receptorje v celicah za sprejem hormonov in tako ovira delovanje naravnih hormonov ali pa vpliva na sintezo, transport in metabolizem hormonov. Nonilfenol lahko vpliva na endokrini sistem neposredno, tako da se veže na receptor za estrogen ali posredno z interakcijo z drugimi komponentami endokrinega sistema (Fent, 1995). Nizke koncentracije nonilfenola v vodnem okolju so nevarne vsem vodnim živalim, ki živijo v okolju, kamor se iztekajo tovarniške odplake. Dokazana je bila toksičnost nonilfenola za ribe, nevretenčarje, alge, glive, glodalce in sesalce. Ker se nonilfenol akumulira v sedimentih in živih organizmih, se tako koncentrira in je nevaren tudi za ljudi. Z nonilfenolom onesnažene vode lahko zaidejo v podtalnico, ki v Sloveniji predstavlja najpomembnejši vir pitne vode za prebivalstvo.

#### 1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Ker je vpliv nonilfenola na različne organizme znan in dokazan, smo predpostavljali, da bomo lahko zaznali tudi njegov vpliv na pritrjeno mikrobno združbo v pretočnem bioreaktorju. V takšnih sistemih namreč tehnologi preučujejo in poskušajo vzpostaviti optimalne razmere za učinkovito razgradnjo nonilfenola, seveda s pomočjo specifičnih, a doslej še neznanih mikroorganizmov. Namen tega dela je bil z molekularnimi metodami (izolacija skupne mikrobne DNA, pomnoževanje ribosomskih genov z verižno reakcijo s polimerazo, poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu, molekularno kloniranje in sekvenciranje) ugotoviti ali in kako nonilfenol vpliva na strukturo pritrjene združbe mikroorganizmov v biofilmu.

#### 2 PREGLED OBJAV

#### 2.1 MOTILCI ENDOKRINEGA SISTEMA

Motilci hormonskega sistema so snovi iz antropogenih in naravnih virov, ki vplivajo na endokrini sistem tako, da mu spremenijo funkcijo, ter vplivajo na rast, razvoj in razmnoževanje živih bitij. V vodno okolje pridejo z odplakami iz kmetijskih virov, ter z industrijskimi in gospodinjskimi odplakami (Scruggs in sod., 2005). Med motilce hormonskega sistema spadajo sintetični hormoni, ki jih uporabljajo v farmacevtski industriji za produkcijo zdravil, kot na primer učinkovine za znižanje količine lipidov, beta zaviralci, antibiotiki in analgetiki. Prav tako se pojavljajo v pesticidih in industrijskih kemikalijah. Eden najbolj znanih motilcev je DDT (di-kloro-di-fenil-tri-kloroetan), ki so ga desetletja množično uporabljali. V industrijskih kemikalijah pa pogosto zasledimo npr. bisfenol A in dioksine. Med motilce hormonskega sistema spada tudi nonilfenol.

Motilci endokrinega sistema so molekule, ki posnemajo delovanje naravnih hormonov, se vežejo na receptor za naraven hormon in z vezavo stimulirajo kemično reakcijo v telesu in tako onemogočijo vezavo naravnemu hormonu ali pa vplivajo na sintezo, transport, metabolizem in izločanje hormonov.

Vpliv motilcev endokrinega sistema je že dokazan na različnih živalih, na primer ptičih, ribah, želvah, krokodilih, tjulnih, žabah, itn. (CSTEE, 1999; Matsamura in sod., 2005). Motilci endokrinega sistema pa prav tako vplivajo tudi na mikroorganizme.

#### 2.1.1 Nonilfenol

Nonilfenol (kemijska formula:  $C_{14}H_{24}O$ , M=220,36 g/mol) proizvajajo iz cikličnih intermediatov. Večino nonilfenola uporabijo za izdelovanje različnih kemikalij. Je svetlo rumena močno viskozna tekočina, z rahlo fenolnim vonjem.



Slika 1: 4-nonilfenol (Porter in Hayden, 2002)

Osnovna struktura 4-nonilfenola je prikazana na sliki 1. Stranska veriga ima devet ogljikovih atomov, ki so lahko pritrjeni na različnih mestih na fenolni obroč, kar pomeni, da je možnih več izomer.

Večina nonilfenola v vodnem okolju je produkt mikrobne razgradnje nonilfenol etoksilatov (NPE). NPE so neionski surfaktanti, ki jih proizvajajo z eterifikacijo nonilfenola in kondenzacijo z etilen oksidom v prisotnosti bazičnega katalizatorja. Uporabljajo se kot detergenti in emulzije, ki raztapljajo olje. S sulfonacijo ali fosforilacijo neionskih surfaktantov proizvajajo anionske detergente, mazila, antistatične agense, agense za obdelavo tekstila, emulzifikatorje za kemikalije, ki jih uporabljajo v kmetijstvu, antioksidante pri proizvodnji gum, ipd. (Hoponick, 2005). NPE uporabljajo že več kot 50 let (APE Research Council, 2001). NPE so iz skupine alkilfenol etoksilatov (APE). APE se uporabljajo v velikih količinah, najpogosteje pri procesiranju tekstila, pulpe, papirja, premoga, kovin, usnja, hrane in pijače, recikliranega papirja, plastike in drugih proizvodov. Najdemo jih tudi kot del končnih produktov kot so pesticidi, adhezivi, čistilna sredstva, barve na osnovi lateksa in proizvodi za osebno rabo, kot na primer lepotne kreme (Berryman in sod., 2004). APE, ki se ne porabijo za proizvodnjo končnih produktov, so z odplakami izpuščeni v okolje, kjer z mikrobno razgradnjo iz NPE nastaja tudi nonilfenol (Ike in sod., 2002). Analiza 139 rek v Ameriki je pokazala, da je nonilfenol eden

najpogostejših onesnaževalcev in je pogosto prisoten v višjih koncentracijah kot drugi analizirani onesnaževalci (Kolpin in sod., 2002).

Ker je nonilfenol hidrofoben, se pritrja na delce zemlje in se tudi izpira v podtalnico, ki je glavni vir pitne vode za ljudi. Prav tako ga lahko absorbirajo rastline in se akumulira v živalih. Prisotnost nonilfenola lahko vpliva na mikroorganizme in s tem vpliva na kroženje hranil (Canadian Council of Ministers of the Environment, 2005).

Nonilfenol so odkrili v vodnih vzorcih odvzetih na številnih lokacijah po vsem svetu (Blackburn in Waldock, 1995; Ahel in sod., 1996; Rudel in sod., 1998; Snyder in sod., 1999; Potter in sod., 1999; Kuch in Ballschmiter, 2001). Prav tako so ga odkrili v drugih okoljih, na primer v sedimentih (Bennie in sod., 1997; Bennet in Metcalfe, 1998; Macronimi in sod., 1990), zraku (Dachs in sod., 1999; Van Ry in sod., 2000), v ribah in školjkah (Lye in sod., 1999; Keith in sod., 2001; Ferrara in sod., 2001) in celo v hrani (Guenther in sod., 2002).

#### 2.1.1.1 Vpliv nonilfenola na živa bitja

Akutna toksičnost nonilfenola je bila dokazana tudi pri ljudeh. Ko ga vdihnemo, pogoltnemo ali pride v stik s kožo lahko pri višjih koncentracijah povzroči okvare zgornjega dela respiratornega trakta, okvare oči in kože. Simptomi izpostavljenosti nonilfenolu so: kašelj, sopenje, hripav glas, zadihanost, glavobol, smrkavost in bruhanje (Sigma Chemical Co., 1993). NPE lahko povzročijo prezgoden porod ali okvare zarodka (Sierra Club, 2007).

Vivacqua in sodelavci (2003) ter Recchia in sodelavci (2004) so ugotovili, da nonilfenol neposredno aktivira estrogenski receptor alfa in s tem pospeši rast rakastih celic in bi lahko bil med drugim odgovoren za nastanek raka na prsih.

Tudi Seike in sodelavci (2003) so raziskovali vpliv nonilfenola pri nastanku raka. Zaznali so povečanje števila adenomov in karcinomov v pljučih podgan, ki so bile izpostavljene

nonilfenolu. Tudi tu je nonilfenol induciral rast rakastih celic v pljučih. Nonilfenol je induciral tudi nastanek reaktivnih kisikovih radikalov v pljučnih nevtrofilcih, kar je povzročilo poškodbe DNK.

Novejše raziskave so pokazale, da lahko nonilfenol stimulira akumulacijo lipidov v nekaterih celicah, kot so adipocite in hepatocite, pri katerih lahko povzroči nepravilno delovanje. To povzroči indukcijo metaboličnega sindroma, ta pa lahko povzroči diabetes, zamaščena jetra, hiperlipidemijo in arteriosklerozo. Izpostavljenost nonilfenolu je stimulirala akumulacijo triglicerolov, prav tako so opazili povečanje velikosti celic (adipocit). Po izpostavljenosti nonilfenolu se je tudi povečala akumulacija glicerola v hepatocitah. To pomeni povečano akumulacijo lipidov v jetrih, kar lahko privede do nepravilnega delovanja jeter. Raziskave kažejo, da je lahko nonilfenol tudi povzročitelj debelosti (Wada in sod., 2007).

Kudo in sodelavci (2004) so poročali o inhibitornem efektu nonilfenola na nevronske STEM celice, pri katerih so opazili kondenzacijo jedr, fragmentacijo DNK, morfološke spremembe, apoptozo celic in povišanje aktivnosti kaspaze 3. Nonilfenol je tudi negativno reguliral izražanje genov za sintezo ciklinov a in B1, ki sta glavna regulatorna proteina za prehod celic iz G2 v M fazo, zato so opazili akumulacijo celic v G2/M interfazi. To kaže, da lahko nonilfenol vpliva na različne fiziološke sisteme, nevrogenezo v centralnem živčnem sistemu in reproduktivni sistem. Ugotovili so tudi, da lahko nonilfenol s svojim delovanjem vpliva na imunski sistem (povečanje aktivnosti celic ubijalk).

Nonilfenol in sorodne substance vplivajo tudi na reprodukcijo tako, da motijo normalno delovanje hormonskega sistema. Povzročijo hitrejšo delitev celic in povečanje maternice pri podganah (Soto in sod., 1995; Bicknell in sod., 1995). Lee (1998) je pri poskusih na podganah ugotovil, da nonilfenol povzroči zmanjšano velikost testisov, semenskih veziklov in ventralne prostate, kar zmanjšuje plodnost samcev. Samci težje oplodijo samice, ker te okvare privedejo do znižanja spermatogeneze in posledičnega znižanja števila spermijev. Nonilfenol je imel največji vpliv med spolnim razvojem samcev. Kyselova in sodelavci (2003) pa so ugotovili, da nonilfenol vpliva tudi na kvaliteto sperme pri preiskovanih miših.

V poskusih na kuncih, katerim so nonilfenol nanesli na kožo, je nonilfenol povzročil opekline, otekline in razpad kožnega tkiva. Drugi simptomi so bili diareja, okvare pljuč in jeter (Cox, 2003). Prav tako lahko inhibira eno od reakcij (reverzni elektronski transfer) za prevzem energije iz hrane (Agrese in sod., 1994) in inhibira aktivnost ATP-aze, ki je pomembena za dovajanje energije mišičnim celicam (Michelangeli in sod., 1990). Pri mačkah in psih je NPE povzročil okvare srčne mišice (White in sod., 1994).

NPE lahko povzročijo, da ribji samci producirajo ikre, upad števila samcev, ter onemogočijo parjenje (Sierra Club, 2007). Nonilfenol je toksičen tudi za številne druge živali, na primer čebele, pajke, ribe, školjke, rake, itd.. Pri vodni bolhi *Daphnia magna* že 0.2 ppm nonilfenola povzroči smrt, pri koncentraciji 0,04 ppm pa upade število novorojenih mladičev (Comber in sod., 1993). Za atlantskega lososa je smrtna doza nonilfenola med 0,1 in 0,2 ppm (McLeese, 1981). Nonilfenol v ribah povzroči produkcijo vitelogenina, beljakovine, ki nastaja v ribjih jetrih kot odgovor na delovanje estrogena. Samci pod vplivom nonilfenola producirajo vitelogenin (Jobling in sod, 1993), prekurzor jajčnega proteina, ki se tvori samo pod vplivom estrogenov, to pa pri moških osebkih povzroči nastanek jajčnih celic v testisih, nepravilnosti v razvoju in neplodnost (Fent, 1995). Nonilfenol se lahko akumulira v algah, školjkah, rakih, ribah in racah (Ahel in sod., 1993; Ekelund in sod., 1990; Lye in sod., 1999; Keith in sod., 2001), našli so ga tudi v belugah (Envirodesic, 2000).

Nonilfenol vpliva tudi na rastline in sicer zmanjša uspešnost kalitve semen (Weinberger in Vladut, 1981), poškoduje liste, ustavi ali upočasni rast plodov npr. paradižnika (Harms, 1992). Pri vodnih rastlinah je poškodoval klorofile in kloroplaste ter inhibiral rast (Prasad, 1989).

Nonilfenol vpliva tudi na glive. Pri filamentozni glivi *Neurospora crassa* inhibira rast hif in micelija, podaljša lag fazo, povzroči morfološke spremembe (izguba apikalne dominance, povečano apikalno vejanje, otekanje hif) in povišal vsebnost skupnih proteinov v celicah (Karley in sod., 1997). Karley in sodelavci (1997) so ugotovili, da nonilfenol zavira tudi rast kvasovke *Candida albicans*, zniža vsebnost ATP in inhibira glukozno inducirano ekstracelularno zakisanje. Kollmann in sodelavci (2003) so preiskovali učinek nonilfenola na askomiceto *Fusarium solani*, zigomiceto *Mucor racemosus*, deuteromiceto *Fusarium oxysporum* in dve bazidiomiceti (*Phanerochaete chrysosporium* in *Trametes vesicolor*). Ugotovili so, da nonilfenol pri visokih koncentracijah vpliva na stopnjo kalitve, ki jo inhibira. Pri *F. solani* so opazili morfološke spremembe podobne *N. crassa* in nastanek nezrelih mikrospor. Nonilfenol je tudi induciral produkcijo lakaz - ekstracelularnih oksidaz pri številnih bazidiomicetah, ki povzročajo t.i. belo plesen (*P. chrysosporium* in *T. vesicolor*). To je pozitiven učinek, ki vodi k zmanjšanju dostopnosti nonilfenola in povečanju detoksifikacije. Ta reakcija bi lahko vodila k stabilizaciji nonilfenola v zemlji in s tem preprečila onesnaženje talne vode.

Nonilfenol pri enocelični diploidni algi *Chlamydomonas segnis* inhibira celično delitev tako, da interferira s sintezo ključnih proteinov vpletnih v mitozo (Weinburger in sod., 1987). Za *C. segnis* so tudi ugotovili, da je letalna toksičnost nonilfenola 7µM.

Zaradi dokazane toksičnosti, obstojnosti in akumulacije, je potrebno omejiti uporabo nonilfenola oz. NPE in APE. Zato je 18. junija 2003 Evropski parlament sprejel spremembo direktive v zvezi z omejitvijo trženja in uporabe nekaterih nevarnih snovi in pripravkov (nonilfenola, NPE in cementa) (Evropski parlament in Svet Evropske Unije, 2003). Ta direktiva velja od 17. januarja 2005. V Sloveniji so nonilfenol razvrstili v skupino C, kar pomeni, da sodi med nevarne snovi, za katere moramo sprejeti program za zmanjševanje uporabe. Na nivoju Evropske unije pripravljajo standard kakovosti, ki trenutno kot najvišjo dopustno mejo predvideva koncentracijo nonilfenola za celinske vode 0,33 µg/l in za obalno morje 0,033 µg/l. Rok za oddajo poročil o izvedenih ukrepih, ki morajo biti posredovana Evropski uniji je leto 2009 (ARSO, 2005).

#### 2.1.1.2 Vpliv nonilfenola na mikroorganizme

Vpliv nonilfenola na mikrobno združbo jezerskih sedimentov so Jontofsohn in sodelavci (2002) preučevali v mikrokozmih. Pri najvišjih koncentracijah nonilfenola v sedimentnih vzorcih (1088 in 2024 µg/kg suhe snovi) so zasledili statistično značilno večje število aktivnih bakterijskih celic. Ugotovili so tudi, da nonilfenol ni imel toksičnega učinka na mikroorganizme. Ravno nasprotno, opazili so stimulirajoč učinek nonilfenola na bakterije pri višjih koncentracijah. Predvidevali so, da so mikroorganizmi nonilfenol izkoristili kot dodaten substrat ali pa je s svojo toksičnostjo povzročil smrt zooplanktona in fitoplanktona, ki je sedimentiral in tako zagotovil dodaten substrat za mikrobe. Ugotovili so, da so bile v vzorcih, ki vsebujejo nonilfenol  $\alpha$ ,  $\beta$  in  $\gamma$  proteobakterije najpogostejše. Povečala sta se deleža  $\beta$  in  $\gamma$  proteobakterij, medtem ko se je delež  $\alpha$  proteobakterij nekoliko zmanjšal (pri nizki koncentraciji nonilfenola) ali ostal enak (pri najvišji koncentraciji nonilfenola). Povečal se je tudi delež bakterij, ki pripadajo po Gramu pozitivnim bakterijam z visokim GC deležem, ki so znane kot aktinobakterije, medtem ko se je delež bakterij, ki spadajo v deblo Bacterioidetes nekoliko zmanjšal. To je zanimivo, ker v to deblo sodijo po Gramu negativne bakterije specializirane za degradacijo kompleksnih makromolekul. Do podobnih rezultatov so prišli tudi Lozada in sodelavci (2004), ki so izvajali eksperimente v bioreaktorju z aktivnim blatom in so preučevali vpliv nonilfenol polietoksilatov (NPE) na mikrobno združbo. Uporabili so zelo visoko koncentracijo neionskega surfaktanta in sicer 60 mg/L. Ugotovili so, da se je mikrobna združba po tretiranju z NPE spremenila. V kontrolnih vzorcih so prevladovale aktinobakterije, po tretiranju pa se je povečal delež β proteobakterij, ki so tako postale najbolj številčna skupina bakterij in bi lahko bile odgovorne za razgradnjo nonilfenolnih spojin. Prav tako so ugotovili, da nonilfenol ni bil toksičen za bakterije.

Da je bil delež  $\beta$  in  $\gamma$  proteobakterij po tretiranju z nonilfenolom največji, so ugotovili tudi Soares in sodelavci (2006), ki so preučevali možnost razgradnje nonilfenola v kontinuiranem bioreaktorju pri nizkih temperaturah in njegove vplive na mikrobno združbo.

#### 2.1.1.3 Mikrobna razgradnja nonilfenola

Nonilfenol je v naravi produkt anaerobne razgradnje APE in NPE. Nekatere raziskave so pokazale, da je nonilfenol v naravi hitro podvržen razgradnji (Bennie in sod., 1999), medtem, ko so drugi poročali, da je nonilfenol zelo obstojen, predvsem v anaerobnih razmerah (Vikelsøe in sod., 2002). Nonilfenol je hidrofoben in se zelo rad veže na trdne delce in organski material, ter tako postane težje dostopen za razgradnjo (Dizer in sod., 2002). Bioreaktorji s pritrjeno biomaso so se izkazali za učinkovit mehanizem za odstranjevanje nonilfenola iz tekočih vzorcev (Soares in sod., 2003).

Soares in sodelavci (2003) so preiskusili sposobnost razgradnje nonilfenola v bioreaktorju, ki so ga cepili s čisto kulturo iz rodu *Sphingomonas*. V bioreaktor so dodajali nonilfenol, s katerim so simulirali onesnaženost podtalnice s to kemikalijo, in sfingomonade so uspešno razgradile nonilfenol. Soares in sodelavci (2006) so tudi ugotovili, da se je v bioreaktorju s pritrjeno biomaso nonilfenol uspešno razgradil (razpad fenolnega obroča) pri čemer naj bi sodeloval mikrobni konzorcij, sestavljen pretežno iz proteobakterij.

Preučevali so tudi razgradnjo nonilfenola v zemlji (Chang in sod., 2007; Hseu, 2006) in ugotovili so, da je tudi razgradnja nonilfenola v zemlji posledica mikrobne razgradnje. Razgradnja se je povečevala s temperaturo od 20 do 40 °C, optimalen pH za razgradnjo je bil 7,0. Večja koncentracija nonilfenola je pomenila počasnejšo razgradnjo. Razgradnja nonilfenola se je povečevala z dodajanjem komposta. Razgradnja nonilfenola je bila prav tako povečana, ko so vzorcem drugič dodali nonilfenol. Vsi eksperimenti so potekali v aerobnih razmerah. Izolirali so tudi osem bakterijskih sevov, ki so sposobni razgradnje nonilfenola in ga uporabljajo kot edini vir ogljika. Sev, ki je bil najuspešnejši pri razgradnji, je bil po gramu negativna palčka, ki so jo identificirali kot pripadnika rodu *Ochrobactrum*. Poleg tega seva so avtorji opisali tudi sev iz rodu *Cytophaga*.

Ejlertsson in sod. (1999) in Hesselsøe in sod. (2001) so raziskovali razgradnjo nonilfenola v anaerobnih razmerah. Ugotovili so, da se v anaerobnih razmerah nonilfenol ne razgradi, prav nasprotno, v anaerobnih razmerah sta favorizirana nastanek in akumulacija nonilfenola. Novejše raziskave pa kažejo, da je nonilfenol v anaerobnih razmerah prav tako

lahko podvržen mikrobni razgradnji. Mikrobna združba se mora najprej prilagoditi na nov substrat in nato lahko poteče njegova razgradnja. In sicer so Chang in sodelavci (2007) ugotovili, da je razgradnja nonilfenola bolj učinkovita v razmerah, ki omogočijo sulfatno ali nitratno redukcijo oziroma metanogenezo.

#### **3** MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Vzorci

Vzorce smo pridobili iz pretočnega bioreaktorja z volumnom 10 litrov (r = 13 cm, h = 80 cm) v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Bioreaktor je bil napolnjen s plastičnimi nosilci, na katerih se je formiral biofilm. Posamezne vzorce smo pridobili tako, da smo s površine 10 plastičnih nosilcev iz nivoja približno 10 cm pod zgornjo mejo sloja nosilcev postrgali mikrobno biomaso.



Slika 2: Shema bioreaktorja

#### 3.1.1.1 Testna vzorca

Da bi lahko ugotovili katera metoda je najbolj primerna za izolacijo skupne mikrobne DNK in kateri začetni oligonukleotidi so najbolj primerni za reakcijo pomnoževanja DNK s polimerazo, smo pred začetkom poskusa odvzeli t.i. testna vzorca. Testna vzorca sta bila odvzeta iz istega bioreaktorja, v pred poskusnem obdobju, ko je bil kot glavni substrat namesto acetata glukoza.

#### 3.1.1.2 Poskusni vzorci

V pretočnem bioreaktorju s pritrjeno biomaso smo kot osnovna substrata uporabili acetat in nitrat. V Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo so z dodatkom KNO<sub>3</sub> v vodovodno vodo simulirali onesnaženje podtalnice z 170 mg/L nitrata (~40 mg/L NO<sub>3</sub>-N). Razmerje KPK/N je bilo 4,0. Z dodatkom nonilfenola smo simulirali pogoje, če bi prišlo do hkratnega onesnaženja podtalnice z nonilfenolom. Ker je nonilfenol hidrofoben, ga je težko popolnoma raztopiti v vodi, se pa dobro topi v acetonu. Zato smo v bioreaktor dodajali nonilfenol raztopljen v acetonu. Z reciklom (Q recikla = 5 Q vtoka) smo vzdrževali enotne koncentracijske profile po celotnem reaktorju, spremljali analize vtoka in iztoka, ohranjali konstantno obremenitev (organsko in dušikovo), razmerje KPK/N v vtoku in hidrodinamične razmere v reaktorju.

Vzorci - datum vzorčenja:

- 1. vzorec z nitratom in acetatom (acetat 1) 09.12.2005
- 2. vzorec z nitratom in acetatom (acetat 2) 19.12. 2005
- 3. vzorec z nitratom in acetatom (acetat 3) 15.01.2006
- 4. vzorec z nitratom in acetatom (acetat 4) 25.01.2006
- 1. vzorec z nitratom, acetatom in acetonom (aceton 1) 28.02.2006
- 2. vzorec z nitratom, acetatom in acetonom (aceton 2) 16.03.2006
- 3. vzorec z nitratom, acetatom in acetonom (aceton 3) 31.03.2006
- 1. vzorec z nitratom, acetatom, acetonom in nonilfenolom (nonilfenol 1) 21.04.2006
- 2. vzorec z nitratom, acetatom, acetonom in nonilfenolom (nonilfenol 2) 08.05.2006
- 3. vzorec z nitratom, acetatom, acetonom in nonilfenolom (nonilfenol 3) 18.05.2006
- 1. vzorec z nitratom in acetatom-končni (acetat končni 1) 29.05.2006
- 2. vzorec z nitratom in acetatom-končni (acetat končni 2) 08.06.2006

Zaradi lažje ocene vpliva nonilfenola na pritrjeno biomaso v pretočnem bioreaktorju smo sistem izpostavili relativno visoki koncentraciji nonilfenola in sicer 1 mg/L. Ker je nonilfenol hidrofoben smo ga morali raztapljati v acetonu. Zato smo v bioreaktor določen čas dodajali tudi aceton brez nonilfenola, da smo ugotovili ali ima aceton sam po sebi vpliv na pritrjeno biomaso.

### 3.1.2 Kompleti

- komplet za izolacijo skupne mikrobne DNK MoBio, Ultra clean soil DNA isolation kit (MoBio laboratories Inc., ZDA)
- komplet za čiščenje PCR pomnožkov: High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Nemčija)
- komplet za kloniranje pGEM-T Vector Systems (Promega Corp., Madison, ZDA)

#### 3.1.3 Pufri in raztopine

Preglednica	1: Pufri	in raztopine,	ter njihova	sestava.
-------------	----------	---------------	-------------	----------

Ime	Sestava
pufer TE, pH 8.0	10 mM Tris-HCl, pH 8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
pufer TBE 0,5×	0,045 M Tris-borat 0,001 M EDTA, pH 8.0
pufer TAE 1×	0,04 M Tris-acetat 0,001 M EDTA, pH 8.0
10 x <i>Taq</i> pufer	50mM KCl 100mM Tris-HCl 15 mM MgCl <sub>2</sub> 1% Triton X
CTAB/NaCl	10% (w/w) heksadeciltrimetil amonijev bromid 0,7 M NaCl
SDS 10%	10% (w/w) natrijev dodecilsulfat
raztopina za alkalno lizo I	50 mM glukoza 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 10 mM EDTA, pH 8.0
raztopina za alkalno lizo II	0,5 M NaOH 1% (w/w) natrijev dodecilsulfat
raztopina za alkalno lizo III	3 M kalijev acetat 11,5% (v/v) led ocetna kislina
raztopina CaCl <sub>2</sub> za pripravo kompetentnih celic	0,1 M CaCl <sub>2</sub>

#### 3.1.4 Bakterijski sevi

Za kloniranje smo uporabili sev bakterije Escherichia coli TOP10.

Genotip:

F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 araD139 galU galK  $\Delta$ (ara-leu)1697 rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG

#### 3.1.5 Gojišča

Uporabili smo trdna in tekoča gojišče LB (Luria-Bertani), ki smo jim dodali antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 100 µg/ml. LB gojišča smo pripravili iz že pripravljenih mešanic LB Agar in LB Broth, Miller (Difco laboratories, ZDA), po navodilih proizvajalca. Za en liter tekočega gojišča LB smo uporabili 25 g mešanice LB Broth, ki vsebuje 10 g NaCl, 10 g triptona in 5 g kvasnega ekstrakta. Za en liter trdnega LB smo uporabili 40 g mešanice LB agar, ki vsebuje 10 g NaCl, 10 g triptona, 5 g kvasnega ekstrakta in 15 g agarja. Ampicilin smo dodali po avtoklaviranju. Tekoče gojišče smo najprej ohladili na sobno temperaturo in šele nato aseptično dodali ampicilin. Trdno gojišče smo ohladili na približno 50 °C, aseptično dodali ampicilin, ter gojišče ob upoštevanju aseptičnih tehnik razlili v plastične petrijevke.

#### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Izolacija skupne mikrobne DNK

#### 3.2.1.1 Izolacija skupne mikrobne DNK z MoBio kompletom

Izolacijo skupne mikrobne DNK z MoBio kompletom smo izvedli po navodilih proizvajalca tega kompleta. V priložene 2 ml mikrocentrifugirke smo vnesli 0,5 ml vzorca. To smo rahlo premešali, dodali 60 µl raztopine S1, ter ponovno rahlo premešali. Nato smo dodali 200 µl raztopine IRS (raztopina za odstranjevanje inhibitorjev PCR reakcije). Obe raztopini sta vključeni v komplet. Mešanico smo nato mešali 10 minut na vrtinčnem mešalu pri največji hitrosti. Potem smo vzorce centrifugirali pri 10.000 x g 30 sekund, prenesli supernatant v nove mikrocentrifugirke, dodali 250 µl raztopine S2 in mešali na vrtinčnem mešalu 5 sekund. Sledila je 5 minutna inkubacija na 4 °C. Nato smo eno minuto centrifugirali pri 10.000 x g, prenesli 450 µl supernatanta v novo mikrocentrifugirko, dodali 900 µl raztopine S3, ter mešali na vrtinčnem mešalu 5 sekund. Približno 700 µl smo nanesli na mikrokolono in centrifugirali 1 minuto pri 10.000 x g. Dodali smo 300 µl raztopine S4 in ponovno centrifugirali 30 sekund pri 10.000 x g. Filtrat smo odstranili, centrifugirko z mikrokolono ponovno centrifugirali in mikrokolono prenesli v čisto mikrocentrifugirko. Na sredino filtra mikrokolone smo nanesli 50 µl raztopine S5, centrifugirali 30 sekund, ter odstranili mikrokolono. DNK se je sprostila v mikrocentrifugirko.

#### 3.2.1.2 Izolacija skupne mikrobne DNK z metodo s krogličnim stresalcem (beadbeater)

500  $\mu$ l vzorca smo centrifugirali 5 minut pri 7.000 x g, odstranili supernatant, dodali 567  $\mu$ l pufra TE in prenesli v mikrocentrifugirke, ki so vsebovale 1,2 g cirkonij-silikagelnih kroglic s premerom 0,5 mm (0,6 g) in 0,1 mm (0,6 g) (Biospec Products, Bartsville). Mešanico smo stresali v krogličnem stresalcu (Mini-beadbeater 3110BX, Biospec Products, Bartsville ZDA) pri 500 stresajih v minuti 3 x po 30 sekund, med intervalom pa

smo vzorec 2 minuti hladili na ledu. Po stresanju smo dodali 100  $\mu$ l 5M NaCl in 80  $\mu$ l 10 % CTAB v 0,7 % NaCl, segretega na 65 °C, premešali in inkubirali pri 65 °C 10 minut. Za ekstrakcijo DNK smo dodali enak volumen kloroforma, premešali in centrifugirali 10 minut pri 12.000 x g. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v svežo mikrocentirfugirko. Dodali smo ji enak volumen mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1), premešali in ponovno centrifugirali 10 minut pri 12.000 x g. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v svežo mikrocentirfugirko. DNK iz zgornje vodne faze smo oborili z izopropanolom, ki smo ga dodali 0,6 volumna vodne faze. Po centrifugiranju 15 minut pri 14.000 x g smo odstranili supernatant in sprali usedlino in stene mikrocentrifugirke z enim ml 70 % ledeno hladnega etanola. Nato smo centrifugirali 10 minut pri 14.000 x g pri 4 °C, in odstranili supernatant. Usedlino smo posušili pri sobni temperaturi ter DNK raztopili v 35  $\mu$ l 10 mM TE pufra.

#### 3.2.1.3 Izolacija skupne mikrobne DNK z metodo z ultrazvočnim dezintegratorjem

500 µl vzorca smo centrifugirali 5 minut pri 7.000 x g, odstranili supernatant, usedku dodali 600 µl TE pufra, ter vse skupaj dobro premešali. Mikrocentrifugirke smo prenesli v dezintegrator Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (ISTCP Inc., New Jersey, ZDA), ter v treh ciklih po 30 sekund z vmesnimi 30 sekundnimi prekinitvami ultrazvočno razbili celice. Mikrocentrifugirke so bile med samim postopkom ultrazvočnega razbijanja celic neprestano namočene v ledeno kopel. Razbite celice smo centrifugirali 10 minut pri 12.000 x g, supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko, mu dodali 100 µl 5M NaCl in 80 µl 10 % CTAB v 0,7 % NaCl segretega na 65 °C, premešali in inkubirali pri 65 °C 10 minut. Za ekstrakcijo, oboritev in spiranje DNK smo uporabili enak protokol kot pri metodi za izolacijo DNK s krogličnim stresalcem (Podpoglavje 2.1.2).

3.2.1.4 Izolacija skupne mikrobne DNK s proteinazo K, SDS-om in fenolom

0,5 ml vzorca smo centrifugirali 15 minut pri 7.000 x g, odlili supernatant in celice resuspendirali v 567 ml TE pufra. Mešanici smo dodali 30  $\mu$ l 10 % SDS in 3  $\mu$ l 20 mg/ml proteinaze K, premešali in inkubirali 1 uro pri 37 °C. Po inkubaciji smo DNK ekstrahirali s kloroformom, jo oborili in sprali po enakem protokolu kot pri metodi za izolacijo DNK s krogličnim stresalcem (Podpoglavje 2.1.2).

# 3.2.2 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200 µl mikrocentrifugirkah (MicroAmp, Elmer Perkin, ZDA). Tarčne odseke genov za 16S rRNK smo pomnoževali v cikličnem termostatu My Cycler<sup>™</sup>, thermal cycler (BioRad, ZDA). Vse uporabljene kemikalije izdeluje Fermentas MBI, Litva. Volumen mešanic smo dopolnili do 20 µl s sterilno destilirano vodo za celične kulture (Sigma, ZDA).

Začetni	Sekvenca	Reference
oligonukleotid		
GC-Eub338f	5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG	Amann in sod., 1995
	CCG CCG CCG CCG CAC TCC TAC GGG AGG	
	CAG CAG -3'	
534R	5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'	Medlin in sod.,
F968-GC	5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG	Nübelin in sod., 1996
	GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA	
	CCT TAC -3'	
1401r	5'- GCG TGT GTA CAA GAC CC -3'	Nübelin in sod., 1996
fD1	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Weisburg in sod., 1991
M13 rev (-29)	5'- CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'	Standardni sekvencijski začetni
		oligonukleotid
M13 uni (-21)	5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'	Standardni sekvencijski začetni
		oligonukleotid

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo.

		T		
Začetna	GC-Eub338f in	F968-GC in 1401r	fD1 in 1401r	M13rev in
oligonukleotida	534R			M13uni
10x pufer <i>Taq</i> (μl)	2	2	5	2
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,9	2	5	2,5
dNTP (mM)	0,15	0,2	0,5	0,2
Začetni	0,04	0,25	0,5	0,125
oligonukleotid				
(µM)				
Taq	0,2	0,12	0,3	0,2
polimeraza(µl)				
DNK (µl)	1	1	1	1
Začetna	94/180	95/180	95/180	94/180
denaturacija T/t				
(°C/s)				
Število ciklov	35	35	35	35
Denaturacija T/t	94/45	95/30	95/30	94/60
(°C/s)				
Prileganje T/t	56/30	56/30	56/45	55/60
(°C/s)				
Polimerizacija	20	80	90	90
72°C (s)				
Podaljšana	600	600	900	600
polimerizacija				
72°C (s)				
Zaustavitev	$\infty$	$\infty$	$\infty$	$\infty$
reakcije 4°C				

Preglednica 3: Mešanice in protokoli za PCR reakcije.

#### 3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Za ugotavljane uspešnosti izolacije DNK in za ločevanje PCR pomnožkov smo uporabili horizontalno agarozno gelsko elektroforezo. Gele smo pripravili s segrevanjem ustrezne količine agaroze v  $0,5 \times$  pufru TBE. Za ugotavljanje uspešnosti izolacije DNK smo uporabili 0,8 - odstotne agarozne gele (w/v), za ločevanje PCR pomnožkov pa 1-odstotne (w/v) agarozne gele. Gele smo vlili v elektroforetske banjice, kjer so pri sobni temperaturi polimerizirali. Elektroforeza je potekala v  $0,5 \times$  TBE pufru 60 minut pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gele barvali 5 do 15 minut v raztopini etidijevega bromida koncentracije 1 µg/ml in jih nato razbarvali 15 do 30 minut v destilirani vodi. Gele smo pregledovali na transiluminatorju Gel Doc 1000 s sistemom za zajemanje in obdelavo slike Molecular Analyst 1.4 (BioRad, Hercule, ZDA). Nekatere gele smo barvali z barvilom SYBR Gold (1-kratna raztopina barvila v 1-kratnem TAE pufru) (Invitrogen SYBR Gold nucleic acid gel stain, Molecular Probes Inc., Eugene, ZDA) 30 do 40 minut in jih nato razbarvali 10 minut v destilirani vodi. Takšne gele smo pregledovali s sistemom Chemi Genious2 (Bio ImagingSystem, Syngene, Velika Britanija).

## 3.2.4 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE; angl. *denaturing gradient gel electrophoresis*)

Za elektroforetsko ločitev pomnožkov PCR, ki smo jih pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov F968-GC in 1401r, smo uporabili sistem D GENE<sup>TM</sup> (Bio-Rad, ZDA).

Za ločitev pomnožkov smo pripravili gel z 8 % koncentracijo poliakrilamida (akrilamid/bis-akrilamid 37,5:1) in naraščajočo koncentracijo denaturanta (formamid in urea) od 40 % do 60 %. Elektroforeza je tekla 17 ur z 1-kratnim TAE pufrom pri 60 °C in 75 V.

PCR produkte smo nanašali na gel zmešane z enakim volumnom 2-kratnega nanašalnega pufra z glicerolom (0,05 % bromfenol modro, 0,05 % ksilen cianol, 70 % glicerol, voda). Po končani elektroforezi smo gel barvali približno 30 minut v 1-kratni raztopini barvila SYBR Gold v 1-kratnem TAE pufru (Invitrogen SYBR Gold nucleic acid gel strain, Molecular Probes). Gel smo nato 5 minut spirali v razbarvalni raztopini, ter ga pogledali s sistemom Chemi Genious2 (Bio ImagingSystem, Syngene, Velika Britanija).

Z DGGE ločimo PCR pomnožke, ki so enako dolgi, vendar imajo različno nukleotidno sekvenco. Ločitev temelji na zmanjšanju elektroforetske mobilnosti delno denaturirane dsDNK molekule v poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje linearni gradient denaturanta (mešanica uree in formamida). Ko domena z najnižjo temperaturo tališča ( $T_m$ ) v molekuli DNK doseže svojo  $T_m$  na specifični poziciji v denaturirajočem gelu, se migracija molekule praktično ustavi. GC spona prepreči popolno denaturacijo DNK dvojne vijačnice. Razlike v sekvenci znotraj teh domen pomenijo razlike v  $T_m$ , zato se DNK molekule z razlikami v

sekvenci ustavijo na različnih pozicijah v gelu (Muyzer in Smalla 1998, Muyzer in sod. 1993, Muyzer 1999).

#### 3.2.5 Kloniranje

3.2.5.1 Priprava PCR pomnožkov za vstavljanje v plazmidni vektor

PCR pomnožke pomnožene z začetnima oligonukleotidoma fD1 in 1401r smo najprej očistili s kompletom za čiščenje PCR produktov 'High Pure PCR Product Purification Kit' (Roche, Mannheim, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Po čiščenju smo ponovili agarozno elektroforezo, ocenili količino pomnožka v vzorcu, ter izračunali količino pomnožka, ki smo jo dodali ligacijski mešanici za optimalno ligacijo. Uporabili smo razmerje vključek:vektor 3:1. Formula za izračun (pGEM-T technical manual):

pri čemer je VE vektor in VK vključek. ...(1)

3.2.5.2 Ligacija in transformacija plazmidnega vektorja pGEM-T in PCR pomnožkov

Ligacijo smo izvedli po protokolu proizvajalca kompleta za kloniranje pGEM-T. Ligacijska mešanica je vsebovala 5  $\mu$ l 2-kratnega ligacijskega pufra, 1  $\mu$ l vektorja pGEM-T (50 ng), 2  $\mu$ l očiščenega produkta PCR, 1  $\mu$ l T4 DNA ligaze (3 Weiss enote/ $\mu$ l) in sterilno vodo (sigma) do 10  $\mu$ l. Ligacijsko mešanico smo inkubirali 2 uri pri 22 °C.

Za transformacijo smo uporabili kompetentne celice *E.coli* TOP 10. Kompetentne celice smo pripravili po metodi s CaCl<sub>2</sub>. V 3 ml tekočega gojišča LB s streptomicinom smo cepili *E. coli* TOP10 in inkubirali preko noči (~16h) v stresalniku pri 37 °C in frekvenci 225 stresajev/min. Po inkubaciji smo 0,5 ml kulture prenesli v 50 ml svežega tekočega gojišča
LB in inkubirali pri 37 °C in frekvenci 300 stresajev/min, do absorbance (OD<sub>600</sub>) 0,4 do 0,5. Kulturo smo prelili v ledeno hladne centrifugirke, jih 20 minut inkubirali na ledu in nato kulturo centrifugirali 10 minut pri 2300 × g pri 4 °C. Supernatant oz. gojišče smo odstranili, usedek pa previdno resuspendirali v 10 ml ledeno hladnega 0,1 M CaCl<sub>2</sub> in ga inkubirali na ledu 20 minut. Po inkubaciji je sledilo 10-minutno centrifugiranje pri 2300 × g pri 4 °C. Nato smo supernatant odlili, s pipeto odstranili ostanke supernatanta in usedle celice resuspendirali v 2 ml 15-odstotne (v/v) raztopine glicerola v 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Suspenzijo celic smo alikvotirali po 100  $\mu$ l v ledeno hladne sterilne mikrocentrifugirke in jih hipno zamrznili v absolutnem etanolu ohlajenem na -70 °C. Celice smo do uporabe shranili pri -70 °C.

8 μl ligacijske mešanice smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in jo inkubirali na ledu. Kompetentne celice smo 5 minut inkubirali na ledu in jih nežno premešali. Nato smo 75 μl celic prenesli v mikrocentrifugirko z ligacijsko mešanico, nežno premešali in pustili 20 minut na ledu. Po inkubaciji smo mešanico izpostavili toplotnem stresu (42 °C, 45-50 sekund), nato pa smo jih takoj postavili nazaj na led za 2 minuti. Transformacijski mešanici smo nato dodali 900 µl tekočega gojišča LB (sobne temperature) in inkubirali 90 minut pri 37 °C na stresalniku (150 stresajev/min). Po inkubaciji smo različne alikvote (20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl in 500 µl) transformacijske mešanice aseptično razmazali na trdna gojišča LB z ampicilinom in substratom X-gal (40 µl), ki smo ga predhodno razmazali na gojišče. Nacepljene plošče smo preko noči (približno 16 ur) inkubirali pri 37 °C. X-gal dodamo, da lahko ločujemo celice oz. kolonije, ki vsebujejo samo plazmid in celice, ki vsebujejo plazmid z vstavljenim insertom. Celice, ki so transformirane zgolj s plazmidom, tvorijo modre kolonije. Celice, ki so transformirane s plazmidom z vstavljenim insertom tvorijo bele kolonije.

Na podlagi modro-bele selekcije smo izbrali 52 belih kolonij in jih s cepilno zanko precepili na sveža gojišča LB z ampicilinom in X-gal do posameznih kolonij. Od 52 kolonij se je kasneje za resnično 'bele' izkazalo 48 kolonij, ki smo jih uporabili za nadaljne delo.

#### 3.2.5.3 Izolacija plazmidne DNK

Izolacijo smo izvedli po protokolu za izolacijo plazmidne DNK z alkalno lizo in SDS-om. Posamezne kolonije transformiranih celic E. coli TOP10 smo prenesli v 4 ml tekočega gojišča LB z ampicilinom in jih inkubirali preko noči na stresalniku pri 37 °C in 225 stresajev/min. Po inkubaciji smo 1,5 ml kulture prenesli v sterilno mikrocentrifugirko, centrifugirali 30 sekund pri 14000 x g in 4 °C ter supernatant odstranili. Dodali smo še 1,5 ml kulture, ponovili centrifugiranje ter ponovno odstranili supernatant. Nato smo bakterijske usedke resuspendirali v 100 µl ledeno hladne raztopine za alkalno lizo 1 in vse skupaj močno premešali. Pri tem smo pazili, da se je ves usedek resuspendiral v raztopini. Nato smo dodali 200 µl sveže pripravljene raztopine 2, premešali z obračanjem mikrocentrifugirke, dodali še 150 µl ledeno hladne raztopine 3 in ponovno premešali z obračanjem mikrocentrifugirke. Mešanico smo centrifugirali 5 minut pri 14000 x g in 4 °C in prenesli supernatant v novo mikrocentrifugirko. Izolirano plazmidno DNK smo oborili z 2-kratnim volumnom etanola. Mešanico smo pustili stati na sobni temperaturi in jo nato centifugirali 5 minut pri 14000 x g in 4 °C. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in DNK sprali z 1 ml 70 % etanola in ponovno centrifugirali 2 minuti pri 14000 x g in 4 °C. Ko smo odstranili supernatant, smo posušili pelete na sobni temperaturi, potem pa smo jih resuspendirali v 50 µl TE pufra (pH 8) z 20 µg/ml RNaze.

Metoda temelji na sprostitvi plazmidne DNK iz celic z alkalno lizo. Pri tej metodi ostane kromosomska DNK vezana na ostanke celic, z RNazo v TE pufru pa poskrbimo, da se razgradi tudi sočasno sproščena RNK. Izolacijo plazmidne DNK smo preverili z agarozno elektroforezo v 1-odstotnem (w/v) agaroznem gelu.

#### 3.2.5.4 Čiščenje plazmidne DNK s fenolom in kloroformom

Izolirano plazmidno DNK iz klonov, izbranih za sekvenciranje, smo razredčili do 400 μl s TE pufrom in nato dodali 400 μl mešanice fenol:kloroforma. Vse smo dobro premešali in centrifugirali 1 minuto pri 12000 x g. Po centrifugiranju smo zgornjo vodno fazo prenesli v čisto mikrocentrifugirko, dodali enak volumen kloroforma, ter ponovno centrifugirali 1 minuto pri 12000 x g. Zgornjo vodno fazo smo ponovno prenesli v čisto mikrocentrifugirko.

Etanolna precipitacija je potekala tako, da smo vzorcem najprej dodali NaCl do končne koncentracije 0,2 M. Nato smo dodali dvojni volumen ledeno hladnega etanola, premešali in inkubirali 30 minut na ledu. Po inkubaciji smo vzorce 10 minut centrifugirali pri 0 °C in 14000 x g, odstranili supernatant in dodali 1ml 70% etanola. Nato smo vzorce centrifugirali 2 minuti pri 0 °C in 14000 x g ter odstranili etanol. Oborjeno plazmidno DNK smo resuspendirali v 30  $\mu$ l TE pufra.

Uspešnost čiščenja smo preverili na 1 % agaroznem gelu. Vzorce, v katerih je bila količina plazmidne DNK premajhna, smo koncentrirali v vakuumskem koncentratorju (Eppendorf concentrator 5301, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

#### 3.2.5.5 Sekvenciranje nukleinskih kislin in analiza sekvenc

Plazmidno DNK sekvencirali Z inserti so podjetju Macrogen, Koreja v (www.macrogen.com). Sekvenciranje obojesmerno začetnima je potekalo z oligonukleotidoma M13 rev (-29) in M13 uni (-21), ki prilegata na plazmid (vektor), in sicer na mesta na plazmidu med katera smo vstavili DNK pomnožke in tako omogočata sekvenciranje celotne vstavljene DNK sekvence. Pridobljene sekvence in kromatograme smo najprej pregledali in ročno popravili ugotovljene napake. Nato smo sekvence preliminarno filogenetsko uvrstili s programom Classifier, ki se nahaja v bazi podatkov RDP II 10 (http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp) in poiskali najbolj podobne sekvence v javno dostopnih bazah podatkov z algoritmoma Blast in FASTA 3, ki sta na voljo na spletnih straneh baz podatkov NCBI ter 'GenBank', (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html) in 'EMBL Nucleotide Database' (http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html). Blast in FASTA 3 uporabljata različna algoritma za poravnavo sekvenc in izračunavanje podobnosti. Blast išče lokalne podobnosti in pri izračunavanju podobnosti upošteva le primerjane odseke, medtem ko večjih vrzeli, ki so posledica delecij ali insercij nukleotidov, in odsekov večjih neujemanj ne upošteva.

FASTA 3 pa primerja celotne sekvence, tako da pri izračunu podobnosti poleg nukleotidnih zamenjav upošteva tudi vse vrzeli (insercije in/ali delecije nukleotidov). Sekvence, ki so pokazale nizek odstotek podobnosti s sekvencami v teh bazah podatkov, smo preverili s programom Chimera check. Program Chimera check išče možne himerne sekvence in je na voljo na spletni strani RDP (Ribosomal database project II) (<u>http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU</u>). Vse pridobljene sekvence smo nato analizirali s programi programskega paketa MEGA 4 s katerim smo tudi izrisali filogenetska drevesa.

#### 4 REZULTATI

### 4.1 IZBIRA METODE ZA IZOLACIJO SKUPNE MIKROBNE DNK IZ T.I. TESTNIH VZORCEV

#### 4.1.1 Izolacija skupne mikrobne DNK iz t.i. testnih vzorcev

Izbiro najprimernejše metode za izolacijo skupne mikrobne DNK smo opravili na podlagi predhodne analize dveh t.i. testnih vzorcev, ki sta bila odvzeta iz istega poskusnega bioreaktorja. DNK iz testnih vzorcev smo izolirali s štirimi metodami za izolacijo DNK: z MoBio kompletom, izolacija s krogličnim stresalnikom, z ultrazvočnim sonikatorjem in s proteinazo K, fenolom in SDS-om. Uspešnost izolacije smo preverili z agarozno elektroforezo (Slika 3).



**Slika 3**: Elektroforetska ločitev DNK izolirane iz testnih vzorcev z različnimi metodami. 1= DNK izolirana z MoBio kompletom (štiri ponovitve); 2B = DNK izolirana z metodo s krogličnim stresalnikom, 2S = DNK izolirana z metodo z ultrazvočnim dezintegratorjem; 3= DNK izolirana s proteinazo K, fenolom in SDS-om. VS= velikostni standard 1 kb lestvica (Fermentas).

Kot najmanj uspešna se je pokazala metoda izolacije s proteinazo K, SDS-om in fenolom, saj na agaroznem gelu praktično sploh nismo opazili sledi nukleinskih kislin. Z ostalimi metodami smo izolirali več mikrobne DNK, a je bila v primerih, ko smo uporabili grobe fizikalne postopke za razbijanje mikrobnih celic (metoda s krogličnim stresalnikom in metoda z ultrazvočnim sonikatorjem) DNK močno razbita. DNK, ki smo jo izolirali z MoBio kompletom je bila najmanj poškodovana.

# 4.1.2 Ugotavljanje ustreznosti izolirane mikrobne DNK za pomnoževanje ribosomskih genov z verižno reakcijo s polimerazo

Pri izbiri metode za izolacijo DNK smo upoštevali tudi primernost le-te za pomnoževanje delov genoma z verižno reakcijo s polimerazo.

Izolirano skupno mikrobno DNK iz testnih vzorcev smo z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili z dvema paroma začetnih oligonukleotidov (GC-Eub338F in 534R ter F968-GC in 1401r). To sta para začetnih oligonukleotidov, ki nalegata na evolucijsko ohranjene regije v ribosomskih genih in omogočata pomnoževanje dela genov za 16S rRNK pri večini danes poznanih bakterij. Pomnožke smo ločili z agarozno elektroforezo v 1 % gelu. Pri prvem paru (GC-Eub338F in 534R) smo pomnožili produkte dolge približno 350 baznih parov (Slika 4), pri drugem paru (F968-GC in 1401r) pa smo pomnožili produkte dolge približno 500 baznih parov (Slika 5).



**Slika 4**: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida GC-Eub338F in 534R) iz testnih vzorcev. M= DNK izolirana z MoBio kompletom; B= DNK izolirana s krogličnim stresalnikom; S= DNK izolirana z ultrazvočnim dezintegratorjem; P= DNK izolirana s proteinazo K, fenolom in SDS-om; 1=neredčen vzorec; 2=vzorec redčen 10x, 3=vzorec redčen 100x. VS= velikostni standard 1 kb lestvica (Fermentas).



Slika 5: Agarozna gelska elektroforeza PCR pomnožkov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) iz testnih vzorcev. M= izolacija DNK z MoBio kompletom; B=izolacija DNK s krogličnim stresalnikom; S=izolacija DNK z ultrazvočnim dezintegratorjem; P=izolacija DNK s proteinazo K; 1=neredčen vzorec;2=redčeno 10x, 3=redčeno 100x. VS= velikostni standard 1 kb lestvica (Fermentas).

Na slikah 4 in 5 vidimo, da je v večini primerov pomnoževanje delov ribosomskih genov uspelo. Izjema so bile 100 krat redčen vzorec DNK, ki smo jo izolirali z MoBio kompletom ter DNK izolirana s postopkom s SDS, proteinazo K in fenolom v primeru, ko smo DNK pomnoževali s parom začetnih oligonukleotidov GC-Eub338F in 534R. V vseh reakcijah v katerih smo uporabili ta par začetnih oligonukeotidov, je bilo produkta manj kot v reakcijah, kjer smo uporabili drugi par začetnih oligonukleotidov. Vidimo tudi, da so lise produktov PCR v obeh primerih močno razpotegnjene, kar kaže bodisi na suboptimalne razmere elektroforeze (preveč naložene DNK, neustrezna hitrost ločitve, prenizka koncentracija agaroze), bodisi na velike razlike v dolžini sekvenc pomnoženih z uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi pri organizmih, ki so bili prisotni v vzorcu.

Pomnožke PCR, pomnožene z začetnima oligonukleotidoma F968-GC in 1401r, smo nato ločili še z DGGE v 8 % poliakrilamidnem gelu (Slika 6). Na podlagi kompleksnosti dobljenih DGGE profilov (število različnih prog) smo poskušali oceniti, katera metoda je najprimernejša za izolacijo DNK iz eksperimentalnih vzorcev.



**Slika 6**: Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza PCR pomnožkov (F968-GC in 1401r) DNK izolirane iz testnih vzorcev z različnimi metodami. M=izolacija DNK z MoBio kompletom, B=izolacija DNK s krogličnim stresalnikom, S=izolacija DNK z ultrazvočnim dezintegratorjem, P=izolacija DNK s proteinazo K.

Kot najbolj primerni sta se po ločevanju z DGGE, glede na število opaženih prog izkazali dve metodi, t.j. izolacija DNK z ultrazvočnim dezintegratorjem in izolacija DNK s krogličnim stresalnikom.

Na podlagi vseh rezultatov smo se odločili, da bomo za izolacijo skupne mikrobne DNK uporabili metodo z ultrazvočnim dezintegratorjem, za pomnoževanje DNK pa začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r.

## 4.2 IZOLACIJA SKUPNE MIKROBNE DNK IN POMNOŽEVANJE DELA BAKTERIJSKIH GENOV ZA 16S rRNK Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

Z metodo z ultrazvočnim dezintegratorjem smo izolirali skupno DNK iz vseh vzorcev in namnožili približno 500 nukleotidov dolge pomnožke (Slika 7) genov za 16S rRNK v verižni reakciji s polimerazo, pri kateri smo uporabili začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r.



Slika 7: Agarozna gelska elektroforeza PCR pomnožkov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) iz poskusnih vzorcev. Številke so oznake posameznih vzorcev. VS= velikostni standard 1kb lestvica (Fermentas).

Na sliki 7 vidimo, da smo uspešno namnožili dele ribosomskih genov pri vseh vzorcih. Količina produktov pri vzorcih pa je bila precej različna. Za vzorce aceton 2, acetat končni 1 in acetat končni 2 smo PCR naredili v po dveh ponovitvah zaradi nekoliko slabše izolacije DNK iz teh vzorcev.

# 4.3 POLIAKRILAMIDNA ELEKTROFOREZA VZORCEV V GRADIENTU DENATURANTA (DGGE)

Pomnožke PCR smo ločili z DGGE v 8% poliakrilamidnem gelu s 40% do 60% gradientom denaturantov (Slika 8).



**Slika 8**: Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza PCR pomnožkov (F968-GC in 1401r) poskusnih vzorcev. Številke so oznake posameznih vzorcev.

Kot vidimo na sliki 8 smo na denaturacijski poliakrilamidni gelski elektroforezi uspešno ločili PCR pomnožke, pri čemer so nastali kompleksni DGGE profili. Pri vseh vzorcih smo opazili eno ali več močnih lis, več srednje močnih lis in veliko šibkih lis. Pri vseh vzorcih lahko vidimo temnejše ozadje, kar lahko nakazuje na to, da se v tam skriva še veliko število dodatnih lis, ki pa so tako šibke, da jih med sabo ne moremo razločiti.

Na podlagi DGGE analize smo ugotovili, da je nonilfenol očitno vplival na strukturo mikrobne združbe v reaktorju s pritrjeno biomaso. Osredotočili smo se predvsem na

primerjavo DGGE profila vzorcev acetat 4 in nonilfenol 3, ki sta končna vzorca za fazi dodajanja teh substratov in sta tako najprimernejša za medsebojno primerjavo. Vzorec acetat 1 je precej drugačen od ostalih vzorcev iz iste serije, kar bi lahko bilo zaradi predhodnega dodajanja glukoze, vzorci acetat 2, 3 in 4 pa kažejo postopno prilagoditev na nov substrat. Vzorci odvzeti ob dodajanju nonilfenola kažejo, da ko se mikrobna združba prilagodi nanj ostaja konstantna in je drugačna kot v vzorcih, v katerih ni bilo dodatka nonilfenola. Aceton smo dodajali, ker smo ga uporabili kot topilo za nonilfenol, ker ima leta hidrofoben značaj. Vzorca aceton 1 in aceton 2 kažeta na verjetno inhibicijo rasti določenih mikrobnih vrst, vzorec aceton 3, pa kaže na ponovno adaptacijo mikrobne združbe. Le-ta je pri vzorcu aceton 3 zelo podobna vzorcu acetat 4, kar bi lahko nakazovalo na to, da se je združba ponovno stabilizirala in da aceton bistveno ne vpliva na spremembo strukture združbe. Vzorca acetat končni 1 in 2 kažeta na ponovno spremembo mikrobne združbe po prenehanju dodajanja nonilfenola in ponovnem dodajanju acetata.

#### 4.4 KLONIRANJE

Da bi ugotovili katere mikrobne vrste so prevladovale, ko smo v bioreaktor dodajali nonilfenol, smo se odločili, da bomo vzorec nonilfenol 3 podrobnejše preučili in sicer tako, da bomo molekularno klonirali pomnožke ribosomskih genov bakterij iz tega vzorca.

Iz izolirane DNK iz vzorca nonilfenol 3 smo v verižni reakciji s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma fD1 – 1401r pomnožili bakterijske ribosomske gene in dobljene pomnožke ločili v 1 % agaroznem gelu (Slika 9 A). Ker smo po elektroforezi poleg pričakovanih pomnožkov opazili še sledi pomnožkov z večjo molekulsko maso, smo produkte očistili s kompletom za čiščenje PCR produktov (High pure PCR product purification kit) in očiščene pomnožke ponovno ločili na 1 % agaroznem gelu (Slika 9 B).



Slika 9: A.= Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov PCR bakterijskih ribosomskih genov vzorca 'nonilfenol 3', pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma fD1 – 1401r. Na gel so nanešene tri ponovitve. B.= Agarozna gelska elektroforeza očiščenih pomnožkov PCR vzorca nonilfenol 3, pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma fD1 – 1401r. Na gel sta nanešeni dve ponovitvi. VS= velikostni standard 1kb lestvica (Fermentas)-3  $\mu$ L.

Kot lahko vidimo na sliki 9 smo uspešno pomnožili približno 1400 bp dolge pomnožke dela genov za 16S rRNK.

Ocenili smo količino pomnožkov PCR glede na znano koncentracijo lise, ki predstavlja 1000 bp v velikostnem standardu (puščici) (v našem primeru je 12 ng/µL) in nato izračunali volumen raztopine s pomnožki, ki smo ga uporabili za optimalno ligacijo. Primer izračuna je podan v protokolu za kloniranje pGEM-T Vector Systems Promega Corp.. Uporabili smo razmerje vključek:vektor 3:1. Za kloniranje smo uporabili sev *E.coli* TOP10 in komplet za kloniranje pGEM-T Vector Systems Promega Corp..

Po uspešnem kloniranju smo izbrali 52 belih kolonij in jih precepili do posameznih kolonij. Za resnično bele kolonije se je po precepljanju na enako gojišče izkazalo 48 kolonij, ki smo jih nato nacepili v tekoča LB gojišča z ampicilinom in po inkubaciji iz njih izolirali transformirane plazmide z vključki. Izolacijo plazmidne DNK smo izvedli z alkalno lizo. Velikost plazmidne DNK z vključki smo preverili na 1 % agarozni elektroforezi. Da bi ugotovili, ali so se v plazmide vstavili vključki pričakovane dolžine, smo naredili analizo PCR v kateri smo uporabili začetna oligonukleotida M13uni in M13rev, ki prilegata na del plazmida, med katerega smo vstavili PCR produkte genov za ribosomske DNK. Plazmidno DNK za PCR reakcijo smo 20 krat redčili. Pomnožke smo ločili na 1 % agaroznem gelu (Slika 10).



**Slika 10**: Agarozna gelska elektroforeza PCR pomnožkov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida M13uni in M13rev) posameznih klonov. Števila označujejo posamezne klone. VS=velikostni standard 1kb lestvica (Fermentas).

Na sliki 10 vidimo, da je večina pomnožkov pričakovane dožine, t.j. približno 1600 bp. Nekaj je prekratkih pomnožkov, kar kaže, da je prišlo do vključitve nespecifičnih produktov. Pri dveh klonih produkta sploh nismo opazili (11 in 22), do česar je prišlo bodisi zaradi neuspelega pomnoževanja, bodisi je pri teh klonih prišlo do transformacije plazmida z naključnim krajšim vključkom.

Nato smo iz izoliranih plazmidov in iz DNK izolirane iz vzorca nonilfenol 3 pomnožili del odseka vključka z začetnima oligonukleotidoma F968-GC in 1401r. Vse pomnožke smo ločili na 1 % agaroznem gelu (Slika 11).



Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza PCR produktov bakterijskih ribosomskih genov (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) posameznih klonov. Števila označujejo posamezne klone. NF- pomnožek dela gena za 16S rRNK iz vzorca nonilfenol 3. Posamezne številke označujejo posamezne klone.

Na sliki 11 vidimo, da smo uspešno namnožili približno 450 baznih parov dolge odseke vkjučkov iz vseh vzorcev. Na sliki vidimo tudi izolirane plazmide v različnih izomerah, kar nakazuje na to da so bili v PCR reakcijski mešanici v prebitku, tako da bi jih morali še bolj redčiti.

Pomnožke (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) bakterijskih ribosomskih genov, vstavljenih v plazmidne vektorje, in pomnožke (začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r) bakterijskih ribosomskih genov iz skupne mikrobne DNK izolirane iz vzorca nonilfenol 3 smo nato ločili na 8 % poliakrilamidnem gelu z gradientom denaturanta (Slika 12).

Posamezen klon naj bi vseboval le en plazmidni vektor z enim vključkom. Zato pri klonih, pri katerih se je pojavilo več prog, domnevamo, da se je bodisi vstavilo več vektorjev z različnimi vključki bodisi en vektor z večimi različnimi vključki. Ker takšni kloni niso primerni za sekvenčno anlizo, smo jih večino iz nadaljne analize izključili.



**Slika 12**: Denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza pomnožkov plazmidnih vključkov iz posameznih klonov in vzorca nonilfenol 3 pomnoženih z začetnima oligonukleotidoma F968-GC in 1401r. Številke označujejo posamezne klone, NF= vzorec 'nonilfenol 3'.

Pri večini vzorcev smo opazili eno samo močno progo, pri nekaterih dve ali več enako močnih prog ali pa eno močno in nekaj šibkejših prog (Slika 12). Proge pomnožkov plazmidnih vključkov smo primerjali s progami pomnožkov bakterijskih ribosomskih genov iz vzorca nonilfenol 3. Tako smo klone lahko razporedili v nekaj skupin. V te smo združili klone katerih pomnožki so se ustavili na isti poziciji ki je ustrezala poziciji določene proge iz vzorca nonilfenol 3. Na podlagi rezultatov smo izbrali 20 klonov za nadaljno analizo (2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 20, 21, 29, 34, 35, 36, 38, 42 in 48).

Glede na položaj pomnožkov smo klone razdelili v nekaj skupin (I. do XII.) in iz vsake izbrali vsaj enega predstavnika za sekvenciranje (označeni z rdečo barvo).

- I. 1, 6, 10, 12, 14, 25, 30, 36, 37, 40, 43 in 47
- II. 5, 13, 15, 24, 27, 28, 35 in 38
- III. 3, 39, 41 in 42
- IV. 26, 34 in 48
- V. 8, 17 in 44
- VI. 21 in 23
- VII. 29 in 31
- VIII. 2
  - IX. **4**
  - X. 9
  - XI. 16
- XII. 20



Slika 13: Elektroforetska ločitev (DGGE) pomnožkov ribosomskih genov iz vzorca nonilfenol 3. Prikazane so oznake klonov.

Slika 13 nam prikazuje DGGE profil vzorca nonilfenol 3, na katerem so prikazane oznake klonov, katerih pomnožki so pripotovali enako razdaljo kot ustrezni pomnožki iz vzorca nonilfenol 3.

Plazmide izbranih klonov za sekvenciranje smo očistili s fenolom in kloroformom, jih oborili z etanolom in resuspendirali v TE pufru. Očiščene plazmide z vključki smo preverili na 1 % agarozni elektroforezi (ni prikazano).

#### 4.5 SEKVENCIRANJE IN SEKVENČNA ANALIZA

Za sekvenciranje smo izbrali 20 klonov. Kromatograme sekvenčnih reakcij smo pregledali s programskim orodjem FinchTV (Geospiza Inc., ZDA). Sekvenčna analiza je bila uspešna za 19 klonov, le kromatogram klona številka 4 je bil neberljiv. Sekvence (Priloga A) smo podrobno pregledali, jih ustrezno ročno popravili poiskali in odstranili mesta naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r. Nato smo sekvence vnesli v z orodjem Classifier, ki se nahaja v bazi podatkov RDP II 10, preliminarno taksonomsko identificirali (Preglednica 4).

Klon	Deblo	Razred	Red	Družina	Rod
3	Proteobakterije	α-proteobakterije	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Xanthobacter
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
5	Proteobakterije	α-proteobakterije	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Xanthobacter
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
6	Proteobakterije	α-proteobakterije	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Xanthobacter
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
14	Proteobakterije	α-proteobakterije	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Xanthobacter
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
20	Proteobakterije	a-proteobakterije	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Xanthobacter
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
	Proteobakterije	a-proteobakterije	Rhizobiales	Hyphomicrobiaceae	Xanthobacter
35	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
	Proteobakterije	a-proteobakterije	Rhizohiales	Hyphomicrobiaceae	Xanthobacter
36	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
38	Droteobakterije	a proteobakterije	Phizobialas	Hyphomicrobiacaaa	(10070) Vanthobactar
		(100%)	(1000/)	(100%)	(1009/)
	Drotocholstoriio	(100%)	(100%) Dhizahialaa	(100%)	(100%)
42		a-proteobakterije	Khizodiales	(100%)	(1000/)
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
9	Proteobakterije	α-proteobakterije	Rhizobiales	unclassified Rhizobiales	
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	
2	Proteobakterije	β-proteobakterije	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Propionivibrio
	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
24	Proteobakterije	β-proteobakterije	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Propionivibrio
54	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
19	Proteobakterije	β-proteobakterije	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Propionivibrio
40	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
16	Proteobakterije	β-proteobakterije	Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	Ferribacterium
16	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
					Xiphinematobacteriace
8	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales (100%)	Xiphinematobacteriaceae	ae genera incertae sedis
0	(100%)	(100%)		(100%)	(100%)
-	·				Xinhinematohacteriace
21	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Xiphinematobacteriaceae	ae venera incertae sedis
-1	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
				unclassified	(10070)
10	Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Vermusermierebiales	
10	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	
				(10076)	
15	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Vellionellaceae	unclassified
15	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	Vellionellaceae
-		Artical	A		(100%)
29		Actinobacteria	Actinomycetales		
	Actinobacteria (100%)	(100%)	(100%)	Cellulomonadaceae	Cellulomonas
		Podrazred:	Podred:	(100%)	(100%)
	()	Actinobacteridae	Micrococcineae		(100,0)
		(100%)	(100%)		

**Preglednica 4**: Identifikacija pridobljenih sekvenc brez mest kamor nalegata začetna oligonukleotida fD1 in 1401r, v oklepajih so navedeni odstotki podobnosti.

Na osnovi enostavne primerjave podobnosti sekvenc genov za 16S rRNK smo lahko pridobljenih 19 sekvenc s programskim paketom MEGA 4.0 uvrstili v pet različnih taksonomskih skupin, kar prikazuje preliminarno filogenetsko drevo (Slika 14).



Slika 14: Filogenetsko drevo za 19 pridobljenih sekvenc (neobtežena metoda parnih skupin z aritmetično skupino – UPGMA). Oznake sekvenc se ujemajo z oznakami klonov.

Sekvencam smo nato poiskali najpodobnejše sekvence v javno dostopnih bazah podatkov GeneBank in EBI z algoritmoma FASTA3 in Blast. Rezultate lahko vidimo v Prilogi A. Vsi rezultati so pridobljeni s sekvencami klonov brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov, saj so ti začetni oligonukleotidi degenerirani. Rezultati pridobljeni s FASTA 3 in Blast algoritmoma so podobni rezultatom pridobljenim z orodjem Classifier. Razlike med rezultati se pojavljajo pri sekvencah, ki izkazujejo zelo nizko podobnost s sekvencami že znanih vrst (možnost himernih sekvenc). Razlike se pojavljajo tudi pri nekaterih sekvencah na nižjih taksonomskih nivojih zaradi nedorečenosti taksonomskega sistema.

Glede na rezultate pridobljene z orodjem Classifier se je deset sekvenc uvrstilo med  $\alpha$ proteobakterije, od tega devet (sekvence klonov 3, 5, 6, 14, 20, 35, 36, 38 in 42) v družino *Hyphomicrobiaceae*, rod *Xanthobacter* in ena sekvenca med neuvrščene rizobiale (sekvenca klona 9). Štiri sekvence so se uvrstile med  $\beta$ -proteobakterije, v družino *Rhodocyclaceae*, od tega tri (sekvence klonov 2, 34 in 48) v rod *Propionivibrio* in ena (sekvenca klona 16) v rod *Ferribacterium*. Tri sekvence so se uvrstile med verukomikrobije, vse v red *Verrucomicrobiales*, od tega dve (sekvenci klonov 8 in 21) v družino *Xiphinematobacteriaceae*, rod *Xiphinematobacteriaceae genera incertae sedis* in ena (sekvenca klona 10) med neuvrščene verukomikrobiale. Sekvenca klona 15 se je uvrstila med firmikute v družino *Veillonellaceae*. Sekvenca klona 29 se je uvrstila med aktinobakterije v družino *Cellulomonadaceae*, rod *Cellulomonas*.

Rezultati iskanja najpodobnejših sekvenc v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast so prikazani v prilogi A in so povzeti v preglednici 5.

Klon	Najpodobnejša sekvenca FASTA 3	Odstotek podobnosti (%)	Najpodobnejša sekvenca Blast	Odstotek podobnosti (%)
3	Xanthobacter flavus	99,4	X. flavus	99.0
5	X. flavus	99,5	X. flavus	99,0
6	X. flavus	99,7	X. flavus	99,0
14	X. flavus	99,7	X. flavus	99,0
35	X. flavus	99,7	X. flavus	99,0
36	X. flavus	99,8	X. flavus	99,0
38	X. flavus	98,8	X. flavus	98,0
42	X. flavus	99,8	X. flavus	98,0
	Uncultured bacterium clone E46	94,5	Uncultured bacterium clone E46	95,0
9	Rasbo bacterium	95,7	Rasbo bacterium	95,0
	Bosea minatitlanensis	93,7	Bosea minatitlanensis	93,0
	Uncultured bacterium clone E46	96,1	Uncultured bacterium clone E46	96,0
20	Rasbo bacterium	94,8	X. autotrophicus	95,0
	X. flavus	94,5	Rasbo bacterium	95,0
2	Uncultured Hyphomicrobiaceae		Propionivibrio dicarboxylicus	93,0
2	bacterium clone Elev_16S_1377	89,2		
34	Rhodocyclus tenius	96,2	R. tenius	96,0
54	Propionivibrio limicola	96,2	P. limicola	96,0
48	P. limicola	97,6	P.limicola	97,0
16	Ferribacterium limneticum	98,9	F. limneticum	99,0
8	unc. bact. clone:CK06-06_Mud_		unc. bact. clone:CK06-06_Mud_ MAS1B-	
	MAS1B-05	99,3	05	99,0
	Spartobacteria bacterium Gsoil	93,6	Spartobacteria bacterium Gsoil	93,0
10	unc. bact. clone:CK06-06_Mud_		unc. bact. clone:CK06-06_Mud_ MAS1B-	
	MAS1B-05	91,2	05	91,0
	Spartobacteria bacterium Gsoil	87,5	Spartobacteria bacterium Gsoil	88,0
21	unc. bact. clone:CK06-06_Mud_		unc. bact. clone:CK06-06_Mud_ MAS1B-	
	MAS1B-05	98,9	05	98,0
	Spartobacteria bacterium Gsoil	93,9	Spartobacteria bacterium Gsoil	94,0
15	Anaerovibrio burkinabensis	91,2	A. burkinabensis	91,0
29	Cellulomonas parahominis	99,0	C. parahominis	98,0

Preglednica 5: Povzetek rezultatov iskanja najpodobnejših sekvenc z algoritmoma FASTA 3 in Blast

Sekvence (kloni 2, 10 in 15), ki so izkazale nizke odstotke podobnosti v bazah podatkov, smo preverili s programom Chimera Check (http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU). Program išče možne himere, ki so artefakti verižne reakcije s polimerazo (rezultati so prikazani v Prilogi B). Uporabili smo dele sekvenc brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r. Vse sekvence je program Chimera Check razdelil na dve sekvenci in podal podobnosti za vsak del sekvence posebej in tudi za celotno sekvenco.

Posameznim delom sekvenc, ki nam jih je predlagal program Chimera Check, smo poiskali najpodobnejše sekvence z algoritmoma FASTA 3 in Blast (Priloga C). Program Chimera Check je za dele sekvence klona 15 podal nizke podobnosti, zato smo v algoritma FASTA 3 in Blast vstavljali različno dolge dele sekvence dokler nismo dobili najboljših možnih podobnosti. Tako smo ugotovili, da je sekvenca klona 15 najverjetneje sestavljena iz treh različnih sekvenc. Rezultati so prikazani v Prilogi D. Povzetek rezultatov iskanja najpodobnejših sekvenc v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast za himerne sekvence so podani v preglednici 5.

Klon	Del sekvence/ dolžina(bp)	Najpodobnejša sekvenca FASTA	Odstotek podobnosti (%)	Najpodobnejša sekvenca Blast	Odstotek podobnosti (%)
2	1./501	X. flavus	99,4	X. flavus	99,0
	2./794	P. dicarboxylicus	97,7	P. dicarboxylicus	97,0
10	1./851	unc. bact. clone:CK06-06_Mud_	98,9	unc. bact. clone:CK06-06_Mud_	98,9
		MAS1B-05		MAS1B-05	
		Spartobacteria bacterium Gsoil	93,8	Spartobacteria bacterium Gsoil	93,0
	2./468	X. flavus	99,6	X. flavus	99,0
15	1./266	Pseudomonas sp.	79,4	Pseudomonas sp.	81,0
	2./997	Uncultured bacterium clone G07	94,7	Uncultured bacterium clone G07	95,0
		Anaerovibrio burkinabensis	94,2	Anaerovibrio burkinabensis	94,0
	3./201	X. autotrophicus	100,0	X. autotrophicus	100,0

**Preglednica 6**: Povzetek iskanja najpodobnejših sekvenc z algoritmoma FASTA 3 in Blast za posamezne dele himernih sekvenc

Za posamezne skupine sekvenc smo v bazi podatkov RDP II 10 glede na taksonomski sistem izbrali sekvence najsorodnejših tipskih vrst in jih analizirali s programskim paketom MEGA 4.0.

#### 4.5.1 Hyphomicrobiaceae

V družino *Hyphomicrobiaceae* spadajo α-proteobakterije, ki so morfološko, metabolno in ekološko dokaj raznolike. Mnoge tvorijo hife ali prosteke, nekatere pa se razmnožujejo z brsti. Lahko izvajajo fotosintezo ali pa so fakultativni metilotrofi, fakultativni kemolitotrofi ali kemolitotrofi (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., 2005).

V bazi podatkov RDP II 10 je v družino *Hyphomicrobiaceae* uvrščenih 21 rodov. Od tega smo v naši analizi uporabili sekvence tipskih sevov posameznih vrst iz naslednjih rodov: *Hyphomicrobium* (8), *Ancylobacter* (4), *Angulomicrobium* (1), *Azorhizobium* (1), *Blastochloris* (2), *Devosia* (4), *Filomicrobium* (1), *Labrys* (2), *Methylorhabdus* (1), *Pedomicrobium* (1), *Rhodoplanes* (2), *Starkeya* (1) in *Xanthobacter* (6).

Filogenetsko drevo (Slika 15) kaže, da se je večina pridobljenih sekvenc (kloni 3, 5, 6, 14, 35 in 36) uvrstila v enotno gručo, ki se uvršča najbližje vrsti *Xanthobacter flavus*. Prav tako je gruča sekvenc klonov 38 in 42 najpodobnejša tej vrsti. Dve sekvenci (klona 9 in 20) sta se v nasprotju z rezultati preliminarne identifikacije z orodjem Classifier uvrstili najbližje pripadnikoma rodu *Labrys*.



**Slika 15**: Uvrstitev klonov 3, 5, 6, 14, 20, 35, 36, 38 in 42 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa s Kimurinim 2-parametričnim algoritmom in testom »bootstrap« s 1000 ponovitvami) družine *Hyphomicrobiaceae* s programskim paketom MEGA 4. Na razvejiščih so odstotki verjetnosti razvejitve. Oznake sekvenc se ujemajo z oznakami klonov.

#### 4.5.1.1 Xanthobacter

So po Gramu negativne palčke, ki so včasih zavite, velike 0,4–1,0 x 0,8–6,0 µm. V gojišču z intermediati trikarboksilnega cikla (predvsem sukcinat) so pleomorfne oblike. Celice so lahko negibljive ali gibljive s peritrihimi flageli odvisno od vrste in od rastnih razmer. Po Gramu se pogosto barvajo kot po Gramu pozitivne ali variabilne bakterije zaradi polifosfatnih vključkov. Glede na ultrastrukturo celične stene pa so to nesporno po Gramu negativne bakterije. Imajo striktno aerobni tip metabolizma (kisik kot terminalni akceptor elektronov). Kolonije so sluzave in rumene barve zaradi karotenoidnih pigmentov. Rastejo lahko kemolitotrofno ali kemoorganotrofno. Lahko razgrajujejo epokside, ker imajo koencim M, ki je drugače tipičen koencim obligatno anaerobnih metanogenih arhej. Lahko fiksirajo dušik. Najpogosteje jih najdemo v vlažni zemlji z razkrajajočim organskim materialom, v sladki vodi, morskih sedimentih in v povezavah s koreninami rastlin (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., 2005).

*Xanthobacter flavus* in *Xanthobacter autotrophicus* sta ob prisotnosti propanola gibljiva s peritrihimi flageli, lahko fiksirata dušik v mikroaerofilnih pogojih, kot edini vir ogljika lahko uporabljata format, acetat, propionat, butirat, piruvat, sukcinat, fumarat, metanol, etanol, n-propanol,  $\alpha$ -ketoglutarat, L-askorbat, metilamine, nekatere sladkorje in nekatere aminokisline. Oba reducirata nitrat do nitrita. Delež GC je za *X. flavus* 68-69 %, za *X. autotrophicus* pa 65-70 %.

Celice vrste *Xanthobacter aminoxidans* so negibljive pleomorfne palčke, ki se razmnožujejo z brstenjem. So obligatno aerobne, reducirajo nitrat do nitrita. Tipski sev je bil izoliran iz čistilne naprave. Delež GC je 69,1 % (Doronina in sod., 2003).

#### 4.5.1.2 Labrys

So po Gramu negativne, negibljive, enocelične ploščate bakterije, ki imajo trikotno radialno simetrijo, velike 1,1-1,3 x 1,3-1,5  $\mu$ m. Iz dveh kotov izraščajo dve do tri kratke prosteke. Celice se razmnožujejo z brstenjem iz kota, ki nima prosteke. So obligatno aerobne, nefermentativne in kemoorganotrofne bakterije, ki uporabljajo ogljikove hidrate in nekatere organske kisline kot edini vir ogljika in energije. Živijo v sladki vodi (sladkovodna jezera). Delež GC je 67,9 % (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., 2005).

#### 4.5.2 Rhodocyclaceae

V družino *Rhodocyclaceae* spadajo po Gramu negativne  $\beta$ -proteobakterije. Družina je fenotipsko, metabolno in ekološko raznolika. Vsebuje fotoheterotrofe, aerobe, anaerobe in fakultativne anaerobe, fermentativne organizme in fiksatorje dušika (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., 2005).

V bazi podatkov RDP II 10 je v družino *Rhodocyclaceae* uvrščenih 16 rodov. Od tega smo v naši analizi uporabili sekvence tipskih sevov posameznih vrst iz naslednjih rodov: *Rhodocyclus* (2), *Azoarcus* (7), *Azonexus* (2), *Azospira* (1), *Azovibrio* (1), *Dechloromonas* (3), *Ferribacterium* (1), *Propionivibrio* (3), *Quatrionicoccus* (1), *Sterolibacter* (1), *Thaurea* (8), *Zoogloea* (3), *Shinella* (2) in *Denitratisoma* (1).

V rod Ferribacterium je uvrščena vrsta Ferribacterium limneticum. V rod Propionivibrio so uvrščene vrste: Propionivibrio limicola, Propionivibrio dicarboxylicus in Propionivibrio pelophilus. V rod Rhodocyclus sta uvrščeni vrsti Rhodocyclus tenius in Rhodocyclus purpureus.

Na filogenetskem drevesu (Slika 16) vidimo, da se je sekvenca klona 16 uvrstila najbližje vrsti *Ferribacterium limneticum*, sekvenca klona 34 najbližje vrsti *Rhodocyclus tenius*, sekvenca klona 48 najbližje vrsti *Propionivibrio limicola*. Del sekvence klona 2 (sekvenca klona 2 je verjetna himera) najbližje vrsti *Propionivibrio dicarboxylicus*.



Slika 16: Uvrstitev klonov 2b\*, 16, 34 in 48 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa s Kimurinim 2-parametričnim algoritmom in testom »bootstrap« s 1000 ponovitvami) družine *Rhodocyclaceae* s programskim paketom MEGA 4. Na razvejiščih so odstotki verjetnosti razvejitve. 2b\*=drugi del himerne sekvence klona 2. Oznake sekvenc se ujemajo z oznakami klonov.

#### 4.5.2.1 Ferribacterium

So striktno anaerobne ravne in zavite palčke  $(0,3-0,5 \times 1,4-2,0 \mu m)$  s poli- $\beta$ hidroksibutiratnimi granulami. Oksidirajo acetat, benzoat, format in laktat z uporabo Fe(III) kot akceptorja elektronov. Acetat lahko oksidirajo tudi z uporabo fumarata ali nitrata kot akceptorja elektronov (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., 2005).

*Ferribacterium limneticum* raste le, ko je prisotno Fe(III) (redukcija) in ne raste ko je prisotno kompleksno organsko gojišče. Kot donorje elektronov lahko uporablja acetat, benzoat, format ali laktat. Tipski sev so izolirali iz jezerskega sedimenta (sladkovodni sediment, blato), ki je bil onesnažen z rudniki.

#### 4.5.2.2 Propionivibrio

So zavite ali ravne palčke, ki so gibljive z enim polarnim bičkom. So striktno anaerobne ali aerotolerantne bakterije, ki se razmnožujejo z binarno delitvijo. So kemoorganotrofi, pri fermentaciji sta končna produkta propionat in acetat. GC delež je 60,8 do 61,6 % (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., 2005).

V vrsto *Propionivibrio dicarboxylicus* spadajo zavite do spiralne palčke z zaokroženimi konci, velike 0,5-0,6 x 1,0-2,0 µm. Gibljive so s polarnim bičkom, ne reducirajo nitrata, sulfata, sulfata in tiosulfata. Uporabljajo lahko malat, fumarat, L-malat kot vir ogljika in energije. Končni produkt sta propionat in acetat. Acetata ne uporabljajo. Najpogosteje se nahaja v anaerobnem blatu v sladkovodnih sedimentih. Delež GC je 61 %.

V vrsto *Propionivibrio limicola* spadajo ravne, tanke palčke, velike 0,6-0,7 x 1,5-2,5  $\mu$ m, prav tako gibljive s polarnim bičkom in nesporogene. So kemoorganotrofi s fermentativnim metabolizmom pri čemer producirajo propionat, acetat in CO<sub>2</sub>. Pri svojem metabolizmu ne uporabljajo sladkorjev, alkoholov, karboksilnih kislin ali aromatskih

kislin. So aerotolerantni zaradi superoksidne dismutaze. Najbolje rastejo v sladkovodnih okoljih (anoksični sladkovodni sedimenti). Delež GC je  $61,6 \pm 2$  %.

#### 4.5.2.3 Rhodocyclus

Celice so tanke, zavite ali ravne, lahko so gibljive s polarnim flagelom ali negibljive. Delijo se z binarno delitvijo. Lahko imajo majhne notranje fotosintetske membrane, ki so povezane s citoplazmatsko membrano. Fotosintetska pigmenta sta bakterioklorofil  $\alpha$  in karotenoidi. V anaerobnih razmerah, svetlobi in ob različnih organskih substratih najraje rastejo fotoheterotrofno, možna je tudi fotoavtotrofna rast. V mikrooksičnih ali oksičnih razmerah je možna tudi kemotrofna rast. Najdemo jih lahko v sladkovodnih okoljih in odpadnih vodah. Delež GC je 64,1-65,1 % (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> ed., 2005).

Celice vrste Rhodocyclus tenius so zavite ali spiralne, velike 0,3-0,5 x 1,5-6,0 µm, včasih tudi daljše. Celice, ki rastejo fotoheterotrofno so rjavo-rdeče. Aerobno rastoče celice so lahko brezbarvne ali pigmentirane. V temi lahko v mikrooksičnih ali oksičnih pogojih rastejo kemotrofno. Lahko fiksirajo dušik. Delež GC je 64,1-64,8 %.

#### 4.5.3 Xiphinematobacteriaceae

V bazi podatkov RDP II 10 sta v družino *Xiphinematobacteriaceae* uvrščena 2 rodova. Od tega smo v naši analizi uporabili sekvence tipskih sevov posameznih vrst iz rodu: *Xiphinematobacter* (3) in izbrane sekvence nekaterih neuvrščenih sevov. Sodijo med verukomikrobije. Večina predstavnikov verukomikrobijev so bakterije, ki živijo v zemlji, nekateri pa so nematodni endosimbionti.

Še negojeni pripadniki novega razreda *Spartobacteria* spadajo v deblo *Verrucomicrobia* in med še neuvrščene *Xiphinematobacteriaceae*. Izbrali smo 29 znanih sekvenc iz skupine še neuvrščenih *Xiphinematobacteriaceae*. Sangwan in sodelavci (2004) so opisali sev Ellin428, ki naj bi sodil v rod *Xiphinematobacteriaceae*. Po Gramu negativne celice seva so ovalne oblike, velike 0,9-1,4  $\mu$ m, pojavljajo so se v parih ali posamezno. Delijo se z binarno delitvijo, so negibljive in imajo poli- $\beta$ -hidroksibutiratne in polifosfatne granule. Nimajo prostek kot ostali predstavniki razreda *Verrucomicrobiae*. Kolonije so rumene barve. So aerobne heterotrofne bakterije, ki lahko rastejo na rastlinski biomasi, rastejo pa tudi na amino kislinah ali organskih kislinah (razen na piruvatu), ko le-ta predstavlja edini vir ogljika in energije. Okoljske sekvence nakazujejo, da so predstavnice spartobakterij v velikem številu globalno zastopane in aktivne zemeljske bakterije.

Filogenetsko drevo (Slika 17) nam kaže, da vse tri pridobljene sekvence (kloni 8, 21 in del sekvence klona 10) tvorijo enotno gručo, ki je najpodobnejša predstavnikoma še neuvrščenih spartobakterij.



**Slika 17**: Uvrstitev klonov 8, 10a\* in 21 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa s Kimurinim 2parametričnim algoritmom in testom »bootstrap« s 1000 ponovitvami) družine *Xiphinematobacteriaceae* s programskim paketom MEGA 4. Na razvejiščih so odstotki verjetnosti razvejitve. 10a\*=prvi del sekvence klona 10. Oznake sekvenc se ujemajo z oznakami klonov.

#### 4.5.4 Veillonellaceae

V bazi podatkov RDP II 10 je v družino *Veillonellaceae* iz redu *Clostridiales* uvrščenih 26 rodov. Od tega smo v naši analizi uporabili sekvence tipskih sevov posameznih vrst iz naslednjih rodov: *Veillonella* (7), *Acetonema* (1), *Acidaminococcus* (2), *Anaeroarcus* (1), *Anaeroglobus* (1), *Anaerosinus* (1), *Centipeda* (1), *Dendrosporobacter* (1), *Dialister* (5), *Megasphaera* (4), *Mitsuokella* (3), *Pectinatus* (4), *Propionispira* (1), *Propionispora* (2), *Selenomonas* (6), *Sporomusa* (8), *Succiniclasticum* (1) in *Zymophilus* (1).

Filogenetsko drevo (Slika 18) kaže, da se je del sekvence klona 15 uvrstil najbližje vrstama Anaeroarcus burkinensis in Anaeromusa acidaminophila.

V rod *Anaeroarcus* je uvrščena tipska vrsta *Anaeroarcus burkinensis*, ki jo predstavljajo po Gramu negativne bakterije. So zavite palčke, velike 0,5 x 1,5-3,0 µm. V mladih kulturah so gibljive z enim polarnim bičkom in so nesporogene. So striktni anaerobi, kemoorganotrofi, ki lahko uporabljajo citrat, fumarat, malat, laktat, piruvat, 1,2-propandiol, dihidroksiaceton, fruktozo, aspartat, glutamat, glicerol fosfat, kvasni ekstrakt in nekatere amino kisline kot vir energije. Za fermentacijo malata, 1,2-propandiola in amino kislin potrebujejo acetat. Najpogostejša fermentacijska produkta sta acetat in propionat. Reducirajo Fe(III), medtem ko sufata in nitrata ne reducirajo. Za rast potrebujejo v gojišču vitamine. GC delež je 44,1  $\pm$  0,1 % (Ouattara in sod. 1992).

Celice vrste *Anaeromusa acidaminophila* so po Gramu negativne zavite palčke gibljive s peritrihimi bički. Imajo striktno anaeroben metabolizem, so fermentatorji in lahko oksidirajo amino kisline. Tipski sev so izolirali iz anaerobnega bioreaktorja. Delež GC je 48 % (Baena in sod., 1999).



**Slika 18**: Uvrstitev klona 15b\* v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa s Kimurinim 2parametričnim algoritmom in testom »bootstrap« s 1000 ponovitvami) družine *Veillonellaceae* s programskim paketom MEGA 4. Na razvejiščih so odstotki verjetnosti razvejitve. 15b\*=drugi del sekvence klona 15. Oznake sekvenc se ujemajo z oznakami klonov.

#### 4.5.5 Cellulomonadaceae

V bazi podatkov RDP II 10 so v družino *Cellulomonadaceae* uvrščeni 3 rodovi aktinobakterij. Od tega smo v naši analizi uporabili sekvence tipskih sevov posameznih vrst iz naslednjih rodov: *Cellulomonas* (15), *Oerskovia* (4) in *Tropheryma* (1).

Na filogenetskem drevesu (Slika 19) vidimo, da se je sekvenca klona 29 uvrstila najbližje vrsti *Cellulomonas hominis*.



0.02

**Slika 19**: Uvrstitev klona 29 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa s Kimurinim 2-parametričnim algoritmom in testom »bootstrap« s 1000 ponovitvami) družine *Cellulomonadaceae* s programskim paketom MEGA 4. Na razvejiščih so odstotki verjetnosti razvejitve. Oznake sekvenc se ujemajo z oznakami klonov.

#### 4.5.5.1 Cellulomonas

Celice so v mladih kulturah tanke palčke, nesimetrične oblike, velike 0,5-0,6 x 2,0-5,0 µm, lahko so ravne ali rahlo ukrivljene, nekatere se pojavljajo v parih, tako da tvorijo črko V, včasih je opazno tudi vejanje, vendar ni tvorbe micelija. Celice v starih kulturah so kratke palčke, lahko se pojavijo koki. Bakterije so pogosto mobilne z enim ali več polarnimi bički in so nesporogene. So po Gramu pozitivne bakterije z visokim GC deležem (71-76 %). So fakultativni anaerobi, kemoorganotrofi, ki imajo respiratorni metabolizem in fermentacijo. Glukozo in druge oglikove hidrate, v aerobnih in anaerobnih pogojih, pretvorijo do kislin. Reducirajo nitrat do nitrita, so celulolitični. Pogosto jih najdemo v zemlji in v razpadajočem rastlinskem materialu.

Celice vrste *Cellulomonas hominis* so kratke in tanke po Gramu pozitivne gibljive palčke. Producirajo kisline, reducirajo nitrat v nitrit. Sevi so izolirani predvsem iz kliničnih vzorcev. Delež GC je 73-76 % (Funke in sod., 1995).

#### 4.5 DGGE PROFIL VZORCA NONILFENOL 3

Glede na rezultate filogenetske analize sekvenc kloniranih ribosomskih genov, DGGE analize PCR pomnožkov iz vzorca nonilfenol 3 in DGGE analize PCR pomnožkov vključkov iz izbranih klonov, smo pripravili verjeten profil mikrobne združbe vzorca nonilfenol 3 iz bioreaktorja s pritrjeno biomaso.



Slika 20: DGGE profil vzorca nonilfenol 3.

Na sliki 20 vidimo, kako so različne bakterijske skupine razporejene vzdolž DGGE gela. Prvih pet lis, ki smo jih uspeli identificirati, pripada vrstam iz družine *Hyphomicrobiaceae*, od tega sta dve šibki lisi, ki pripadata organizmom še najbolj podobnim bakterijam iz rodu *Labrys*. Tri preostale lise, od tega dve močni pripadajo organizmom, ki so sorodni vrsti *X. flavus*. Sledijo jim tri identificirane lise, ki pripadajo vrstam iz družine *Rhodocyclaceae*, in sicer dve lisi predstavljata organizme, ki sodijo v dve ločeni skupini (najbližje vrstama *F.limneticum* in *P.dicarboxylicus*), ena lisa pa predstavlja organizme, ki so podobni predstavnikoma dveh vrst (najbližje *R. tenius* in *P. limicola*). V tem zadnjem primeru ne moremo z zagotovostjo trditi, ali gre za eno ali za dve lisi. Nato sledita dve identificirani lisi, ki predstavljata bakterije podobne še ne gojenim spartobakterijam, ki sodijo v družino
*Xiphinematobacteriaceae*. Na koncu je lisa, ki pripada vrsti *C. hominis* (glede na filogenetsko analizo) oz. *C. parahominis* (glede na FASTA 3 in Blast z 99,0 % podobnostjo). Obe sodita v družino *Cellulomonadaceae*.

Za družino *Veillonellaceae* nismo uspeli identificirati lis na DGGE gelu, kajti sekvenca klona 15, katere večinski del je sicer najpodobnejši sekvencam iz te družine, je bila himera. Ta se je po DGGE analizi ustavila na istem mestu kot sekvence iz skupine II., ki sodijo v družino *Hyphomicrobiaceae*, v rod *Xanthobacter*, kot sekvence klonov 5, 35 in 38.

## 4.6 REZULTATI MERITEV KPK, NITRATA IN NITRITA

Z dodatkom KNO<sub>3</sub> v vodovodno vodo so na Kemijskem inštitutu simulirali onesnaženje podtalnice z 170 mg/L nitrata (~40 mg/L NO<sub>3</sub>-N kot je to razvidno iz preglednice 7). Osnovni organski substrat je bil v vseh primerih acetat. Razmerje KPK/N v vtoku je bil 4,0. V sistem smo uvajali tudi aceton, zato smo s serijo treh vzorčenj preverili možen vpliv acetona na mikrobno združbo. Vsak dan je bilo pripravljenih 100 L vtoka, ki je stekel skozi reaktor. V teh 100 L je bilo dodanih 2 ml čistega acetona (KPK vtoka zato minimalno naraste). V tretji fazi smo začeli dodajati nonilfenol tako, da je bila v vtoku koncentracija nonilfenola 1 mg/L (dodano 2 ml acetona z raztopljenim nonilfenolom).

Rezultati, ki so navedeni v preglednici 7, smo dobili od dr. Janeza Vrtovška, Kemijski inštitut. Njihova laboratorijska napaka pri merjenju nitrata, nitrita in KPK je 10 %. Podani rezultati predstavljajo povprečne vrednosti meritev zaporednih 5-7 dni pri enakih tehnoloških pogojih.

Vzoroo	Acetat			Aceton		Nonilfenol			Acetat končni			
v zorec	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	1	2
Datum meritev in vzorčenja	9.12. 2005	19.12. 2005	15.1. 2006	25.1. 2006	28.2. 2006	16.3. 2006	31.3. 2006	21.4. 2006	8.5. 2006	18.5. 2006	29.5. 2006	8.6. 2006
Vtok												
KPK, mg/L	152	158	155	161	168	171	165	173	179	167	157	162
NO <sub>3</sub> -N, mg/L	37,3	41,2	33,9	38,6	39,2	42,1	43,3	45,2	41,7	43,7	33,8	35,7
NO <sub>2</sub> -N, mg/L	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Iztok												
KPK, mg/L	8	11	15	12	15	17	24	19	26	29	17	12
NO <sub>3</sub> -N, mg/L	0,03	0,5	0,8	0,8	1,2	0,9	1,5	1,8	1,1	0,8	0,05	0,1
NO <sub>2</sub> -N, mg/L	0,03	0,03	0,05	0,05	0,5	0,7	0,3	0,7	0,5	0,5	0,1	0,05

Preglednica 7: Povprečne vrednosti meritev KPK, nitrata in nitrita v času vzorčenja

V preglednici 7 vidimo, da se je nitrat porabljal v vseh fazah eksperimenta. Koncentracija nitrita je glede na koncentracijo pri vtoku ostala enaka ali pa se je nekoliko povišala. Lahko rečemo, da je potekala redukcija nitrata in tudi nitrita skozi ves eksperiment, ne glede na dodatek acetona in nonilfenola. Za to bi lahko bile odgovorne denitrifikacijske bakterije, vendar sekvenc le-teh nismo pridobili. Pridobili smo le sekvence bakterij, ki so najpodobnejše vrstam, ki reducirajo nitrat do nitrita. Rezultati meritev KPK na vtoku in iztoku kažejo, da se je organska snov porabljala v vseh fazah poskusa.

# 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

# 5.1.1 Izbira primerne metode za izolacijo DNK in primernih začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo

Za izbiro najprimernejše metode za izolacijo DNK in primernih začetnih oligonukleotidov za verižno reakcijo s polimerazo smo uporabili testna vzorca, ki sta bila odvzeta iz istega bioreaktorja kot poskusni vzorci. Pri izbiri primerne metode za izolacijo DNK iz vzorcev smo upoštevali predvsem rezultate DGGE analize. DNK smo izolirali iz istega vzorca s štirimi različnimi metodami: z MoBio kompletom, s krogličnim stresalnikom, z ultrazvočnim dezintegratorjem in s proteinazo K, fenolom in SDS-om. Z vsemi metodami smo DNK uspešno izolirali. Sodeč po rezultatih agarozne elektroforeze se je najbolje izkazala metoda z MoBio kompletom, pri kateri smo izolirali najmanj razbito DNK. Sledili sta metoda s krogličnim stresalnikom in metoda z ultrazvočnim dezintegratorjem, pri katerih smo prav tako uspešno izolirali DNK, ki pa je kazala večjo stopnjo razbitosti. Za najslabšo metodo za izolacijo DNK iz našega tipa vzorcev se je izkazala metoda izolacije DNK s proteinazo K, fenolom in SDS-om (Slika 3, podpoglavje 4.1.1).

Za pomnoževanje DNK z verižno reakcijo s polimerazo smo preverili dva para začetnih oligonukleotidov (GC-Eub338F in 534R ter F968-GC in 1401r). Za bolj primeren par začetnih oligonukleotidov se je izkazal par F968-GC in 1401r (Slika 5, podpoglavje 4.1.2), ki daje produkte dolge približno 500 bp, daje boljši izkoristek pomnoževanja DNK in bolj specifične produkte.

Po DGGE analizi smo na podlagi učinkovitosti ločevanja in kompleksnosti profilov, ugotavljali katera metoda za izolacijo DNK je najprimernejša za naš tip vzorca.

Za izolacijo skupne mikrobne DNK iz eksperimentalnih vzorcev smo uporabili metodo z ultrazvočnim sonikatorjem, za pomnoževanje izolirane skupne mikrobne DNK z verižno reakcijo s polimerazo pa začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r.

### 5.1.2 Analiza eksperimentalnih vzorcev

DNK smo iz vseh zbranih vzorcev uspešno izolirali z ultrazvočnim dezintegratorjem in namnožili želeni odsek bakterijskih genov za 16S rRNK. Izvedli smo analizo DGGE, ki je pokazala očiten vpliv nonilfenola na strukturo mikrobne združbe (Slika 8, podpoglavje 4.3). In sicer je skozi celoten poskus pri vseh vzorcih prihajalo do sprememb v strukturi mikrobne združbe, razen pri vzorcih z nonilfenolom. Pri teh vzorcih se je struktura mikrobne združbe stabilizirala in ostala skoraj popolnoma enaka pri vseh treh vzorcih z nonilfenolom. Struktura mikrobne združbe pri vzorcih med dodajanjem nonilfenola je bila tudi precej drugačna od ostalih vzorcev. Kar kaže na to, da ima nonilfenol vpliv na strukturo mikrobne združbe v reaktorju s pritjeno biomaso, tako da jo spremeni in kar je pomembno, da se med dodajanjem nonilfenola struktura mikrobne združbe praktično ni spreminjala. Prevladajo drugi taksoni, nekateri obstanejo, medtem ko drugi propadejo ali pa se njihovo število zmanjša. Da se pri dodajanju nonilfenola mikrobna združba spremeni so poročali tudi drugi avtorji (Lozada in sod., 2004; Jontofsohn in sod., 2002; Soares in sod., 2006).

### 5.1.2.1 Kloniranje in analiza klonov vzorca nonilfenol 3

Vzorec nonilfenol 3 smo podrobneje analizirali, ker najbolje odraža vpliv nonilfenola na strukturo mikrobne združbe, saj se je združba v času do odvzema tega vzorca že prilagodila na nov substrat. Da bi ugotovili, katere vrste so najbolj zastopane v tem vzorcu, smo iz izolirane skupne mikrobne DNK tega vzorca pomnožili bakterijske ribosomske gene z začetnima oligonukleotidoma fD1 in 1401r. Ta omogočata namnožitev večine gena za 16S rRNK in sicer približno 1400 bp dolge odseke tega gena (Slika 9, podpoglavje 4.4). Namnožene PCR produkte smo očistili, jih vnesli v vektor pGEM-T in izvedli transformacijo v celice *E. coli* TOP 10. Transformirane celice smo nagojili v tekočem in nato na trdnih gojiščih LB z ampicilinom in kromogenim analogom laktoze X-gal. Po inkubaciji smo plošče skrbno pregledali in izbrali belih 48 kolonij za nadaljno analizo. Še pred tem smo opravili analizo uspešnosti kloniranja in ugotovili da je pri večini klonov prišlo do vključitve pomnožka pričakovane dolžine.

Nato smo izvedli DGGE analizo klonov in sicer smo iz izoliranih plazmidov s PCR pomnožili del vključkov z začetnima oligonukleotidoma F968-GC in 1401r, pri čemer smo pomnožili odseke dolge približno 500 bp. Te pomnožke in tudi pomnožek iz vzorca nonilfenol 3 smo ločili z poliakrilamidno elektroforezo v gradientu denaturanta, ter jih glede na položaj pomnožkov razdelili v nekaj skupin in vsaj enega predstavnika iz vsake skupine izbrali za sekvenciranje.

V nekaterih primerih smo pri analizi klonov odkrili več kot eno liso na gelu po analizi DGGE. Pri analizi sekvenc moramo upoštevati, da ima večina bakterij več ribosomskih operonov in s tem več kopij genov za rRNK, katerih sekvence so včasih heterogene. V izjemnih primerih so ugotovili, da se sekvence genov za 16S rRNK v različnih operonih lahko razlikujejo tudi do 6,5 % (Wang G. in Wang Y., 1997). Če se sekvence razlikujejo le za nekaj baz, je to verjetno posledica mutacij, ki so nastale med DNK replikacijo. Večje razlike pa so verjetno nastale s horizontalnim genskim prenosom. Takšne velike razlike imajo vpliv na filogenetsko analizo, zato je potrebna previdnost pri interpretaciji rezultatov (Satokari in sod., 2001). Že zaradi manjših razlik v sekvencah rRNK genov iz različnih operonov istega organizma lahko pri DGGE analizi dobimo več različnih prog, ki pa pripadajo istemu organizmu. V našem primeru (Slika 20, podpoglavje 4.6) se je izkazalo, da tri lise na DGGE gelu predstavljajo isto vrsto (*X. flavus*). To bi lahko pripisali bodisi temu, da gre za različne seve, bodisi napakam pri PCR reakcije ali pa prisotnosti različnih operonov.

## 5.1.2.2 Sekvenciranje in sekvenčna analiza

Na podlagi rezultatov analize DGGE smo izbrali 20 klonov, ki smo jih poslali sekvencirati v podjetje Macrogen, Koreja. Sekvenciranje je potekalo dvostransko, tako da smo zajeli celotne sekvence, ki smo jih vstavili v plazmidne vektorje. Od teh dvajsetih klonov je bilo čitljivih devetnajst sekvenc (oz. 38 kromatogramov), ki smo jih pregledali, ustrezno popravili, kjer je bilo to potrebno in jih sestavili v enotne sekvence, tako da smo poiskali mesta prekrivanja. V sekvencah smo poiskali sekvence začetnih oligonukleotidov in jih pred nadaljno analizo odstranili.

Sekvence smo preliminarno taksonomsko uvrstili z orodjem Classifier iz baze podatkov RDP II 10. Ugotovili smo, da se je največ sekvenc uvrstilo med proteobakterije. Deset sekvenc tako sodi med  $\alpha$ -proteobakterije, od tega devet v družino *Hyphomicrobiaceae*, rod *Xanthobacter* in ena med neuvrščene rizobiale. Štiri sekvence so se uvrstile med  $\beta$ -proteobakterije, v družino *Rhodocyclaceae*, od tega tri v rod *Propionivibrio* in ena v rod *Ferribacterium*. Tri sekvence so se uvrstile med verukomikrobije, od tega dve v družino *Xiphinematobacteriaceae* v rod *Xiphinematobacteriaceae genera incertae s*edis in ena med neuvrščene verukomikrobiale. Ena sekvenca se je uvrstila med firmikute, v družino *Veillonellaceae*, neuvrščene *Veillonellaceae*. Ena sekvenca pa se je uvrstila med aktinobakterije v družino *Cellulomonadaceae* v rod *Cellulomonas*.

Sekvence klonov smo najprej preliminarno primerjali med seboj, tako da smo izrisali filogenetsko drevo z neobteženo metodo parnih skupin z aritmetično skupino – UPGMA (slika 14, podpoglavje 4.5). Drevo potrjuje rezultate, ki smo jih dobili z orodjem Classifier in razvršča sekvence klonov v pet različnih skupin.

Nato smo poiskali najpodobnejše sekvence v spletnih bazah podatkov. Pri tem smo uporabili orodji Blast in FASTA 3 (rezultati so podani v prilogah). Sekvence, ki so pokazale nizek odstotek podobnosti najsorodnejšim sekvencam v bazah podatkov, smo preverili še s programom Chimera Check, ki išče himerne sekvence in poda najboljše možne rezultate. Ugotovili smo, da so možne himere sekvence klonov 2, 10 in 15. Delnim sekvencam posmeznih klonov smo nato poiskali najpodobnejše sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI z algoritmoma FASTA 3 in Blast (Priloga C). Za sekvenco klona 15 smo ugotovili, da je dokaj verjetno, da je sekvenca sestavljena kar iz treh različnih sekvenc (Priloga D).

Himerna sekvenca nastane pri pomnoževanju DNK s PCR reakcijo. Glavni vir himernih sekvenc so prehitra terminacija DNK v PCR, ti nedokončani pomnožki pa naležejo na druge homologne verige DNK in služijo kot začetni oligonukleotidi pri nadaljnjem pomnoževanju DNK (Wang G. in Wang Y., 1997). Tako nastane himerna sekvenca, ki je sestavljena iz dveh (ali več) sekvenc različnih organizmov. Himerne sekvence oz. heterodupleksi so glavni vir artefaktov, ki nastajajo med pomnoževanjem DNK izolirane iz

mešanih združb. In sicer se njihova tvorba povečuje, ko pri PCR začne primanjkovati začetnih oligonukleotidov in/ali ko je diverziteta DNK večja (Thompson in sod., 2002). Wang G. in Wang Y. (1997) sta ugotovila, da lahko po 30-ih ciklih PCR reakcije nastane tudi do 32 % himernih sekvenc.

Sekvence klonov smo nato filogenetsko analizirali, pri čemer smo sekvence primerjali s sekvencami predstavnikov vrst posameznih rodov iz družin v katere so se naše sekvence uvrstile. S programom MEGA 4 z metodo sosedskega odnosa, Kimurinim 2-parametričnim algoritmom in testom »bootstrap« s 1000 ponovitvami smo izrisali filogenetska drevesa za posamezne družine v katere so spadale pridobljene sekvence (Slike 15, 16, 17, 18 in 19, podpoglavja od 4.5.1 do 4.5.5).

Rezultati kažejo da večina sekvenc, ki so se uvrstile med α-proteobakterije v družino *Hyphomicrobiaceae*, sestavlja dve ločeni gruči, ki sta najbolj podobni sekvencam vrste *Xanthobacter flavus*. Dve sekvenci pa sta bili uvrščeni v precej ohlapno gručo skupaj s predstavnikoma iz rodu *Labrys*. Naslednjo skupino predstavljajo sekvence, ki so bile najpodobnejše predstavnikom skupine β-proteobakterij iz družine *Rhodocyclaceae*. In sicer so bile sekvence najpodobnejše sekvencam vrst *Ferribacterium limneticum*, *Rhodocyclus tenius*, *Propionivibrio limicola*, ter *Propionivibrio dicarboxylicus*. Pridobili smo tudi sekvence, ki so bile najpodobnejše sekvencam bakterij, ki spadajo med verukomikrobije v družino *Xiphinematobacteriaceae* in so najbolj podobne sekvencam dveh še negojenih sevov spartobakterij, ki so uvrščene v nov razred *Spartobacteria*. Pridobili smo tudi sekvenco, ki je najpodobnejša sekvencam bakterij, ki spadajo med firmikute v družino *Veillonellaceae* in je najpodobnejša sekvencam vrst *Anaerovibrio burkinensis* in *Anaeromusa acidaminophilas*. Prav tako smo pridobili sekvenco, ki je najpodobnejša sekvencam vrst *Cellulomonadaceae* in sicer vrsti *Cellulomonas hominis* (oz. *Cellulomonas parahominis*).

Rezultati se v določeni meri ujemajo z rezultati že objavljenih raziskav tujih avtorjev. Jontofsohn in sod. (2002) so npr. ugotovili, da so v mikrokozmah napolnjenih z onesnaženimi sedimenti in vodo prevladovale alfa, beta in gama proteobakterije. Delež beta in gama proteobakterij se je v njihovem eksperimentu, ob dodajanju nonilfenola povečal, medtem ko se je delež alfa proteobakterij nekoliko zmanjšal. Povečal se je tudi delež aktinobakterij. Lozada in sod. (2004) so prav tako ugotovili, da sta se povečala deleža beta proteobakterij in aktinobakterij po dodajanju nonilfenola v reaktor z aktivnim blatom.

V našem eksperimentu smo zasledili alfa in beta proteobakterije, kot tudi predstavnika aktinobakterij (*Cellulomonas parahominis*). Na osnovi rezlutatov, ki smo jih pridobili z DGGE analizo lahko trdimo, da se je očitno povečalo število bakterij sorodnih vrsti *Xanthobacter flavus*, ki je glede na naše rezultate postala prevladujoča bakterijska skupina med dodajanjem nonilfenola.

Aerobni mikroorganizmi lahko številne aromatske spojine uporabijo kot donorje elektronov. Preučevali so predvsem bakterije iz rodu Pseudomonas. Prvi možni degradacijski produkti aromatskih spojin so večinoma protokatehuat ali katehol oz. strukturno podobne spojine. Te produkte lahko razgradijo do spojin (sukcinat, acetil-CoA in piruvat), ki lahko vstopijo v CCK (cikel trikarboksilnih kislin). Za razgradnjo aromatskih spojin je ponavadi potrebna oksigenaza (mono-, di- oksigenaza). Aromatske spojine so lahko razgrajene tudi anaerobno s strani fakultativno aerobnih bakterij, če aromatska spojina vsebuje kisikov atom. Take aromatske spojine lahko razgrajujejo določene denitrifikacijske, fototrofne bakterije in reducenti železa in žvepla. Anaerobna razgradnja aromatskih spojin poteka z reduktivno namesto z oksidativno cepitvijo obroča. To vključuje redukcijo aromatskega obroča, ki ji sledi cepitev do nerazvejane maščobne kisline ali dikarboksilne kisline. Le-te se lahko pretvorijo do acetil-CoA in uporabijo za biosintezo in procese pridobivanja energije. Prav tako lahko bakterije v anoksičnih pogojih razgradijo aromatske spojine, ki nimajo kisikovega atoma. Benzen, kot je znano, lahko razgradijo nekatere denitrifikacijske bakterije, toluen pa nekateri reducenti železa in prav tako nekateri denitrifikatorji (Madigan in sod., 2003). V našem delu smo uspeli pridobiti sekvence mikroorganizmov, ki so najpodobnejši dvema bakterijskima vrstama, ki reducirata železo in sicer Anaeroarcus burkinensis in Ferribacterium limneticum. To je značilno tudi za rodova v katera spadata. Ti dve vrsti bi lahko bili odgovorni za razgradnjo nonilfenola, česar pa ne moremo zagotovo trditi. Za sev Py2 vrste Xanthobacter autotrophicus (sekvenca klona 20, primerjava sekvenc z Blast, podobnost 95%) so dokazali, da lahko razgrajuje halogenirane aromatske kisline in kloroalkene, vendar dokazov za razgradnjo drugih aromatskih spojin še ni. Za Xanthobacter flavus, Xanthobacter autotrophicus in predstavnike rodu Cellulomonas je znano, da reducirajo nitrat do nitrita. Predstavniki rodu Ferribacterium lahko oksidirajo acetat z uporabo nitrata kot akceptorja elektronov. Predstavniki rodov Xanthobacter in Rhodocyclus lahko fiksirajo dušik. Iz podatkov, ki smo jih dobili iz Kemijskega inštituta vidimo, da sta se nitrat in nitrit porabljala. Zato lahko sklepamo, da so v biofilmu bili tudi reducenti nitrita in/ali denitrifikatorji. Poleg tega je acetat, ki smo ga dodajali v reaktor, zelo dober vir ogljika za denitrifikacijo. Ginige in sod. (2005) so v reaktor z aktivnim blatom dodajali acetat in nitrit. Ugotovili so, da je acetat pospešil denitrifikacijo in da so bile za denitrifikacijo odgovorne predvsem bakterije sorodne bakterijam iz družin Comammonadaceae in *Rhodocyclaceae*, torej predstavniki β-proteobakterij. Z uporabo molekularnih metod so dokazali, da so te bakterije denitrifikatorji, ki lahko uporabljajo acetat kot edini vir ogljika. Tudi mi smo pridobili sekvence podobne sekvencam bakterij iz družine *Rhodocyclaceae*, tako da bi bile lahko tudi te bakterije odgovorne za denitrifikacijo. V primeru, da so za porabo nitrita in nitrata odgovorni denitrifikatorji, bi tudi ti lahko bili odgovorni za razgradnjo nonilfenola. Kot nam kažejo rezultati merjenj nitrata, nitrita in KPK (Preglednica 7, podpoglavje 4.7) je v vseh fazah poskusa potekala redukcija nitrata. Prihaja pa do nihanj v koncentraciji nitrita, vendar je bilo to opaženo tudi pri predhodnih poskusih biološke denitrifikacije samo z osnovnim substratom acetatom. Ker je organski substrat v prebitku, le-tega nekaj vedno ostaja tudi v iztoku. Med potekom poskusa so na Kemijskem inštitutu izvajali tudi meritve nonilfenola v iztoku s plinskim kromatografom, vendar se je to ta analitski postopek izkazal za nezanesljivega. Raztopino nonilfenola tehnološke čistosti, ki smo jo uporabljali pri poskusih, sestavljajo namreč tri izomere, kar predstavlja težavo pri izdelavi umeritvene krivulje.

# 5.2 SKLEPI

- Ugotovili smo, da sta metodi s krogličnim stresalnikom in z ultrazvočnim dezintegratorjem primernejši za izolacijo skupne mikrobne DNK iz mikrobne biomase iz pretočnega bioreaktorja, kot metoda s kompletom za izolacijo skupne mikrobne DNK iz zemeljskih vzorcev MoBio in metoda s proteinazo K, SDS-om in fenolom.
- Ugotovili smo, da sta za pomnoževanje delov ribosomskih genov iz skupne mikrobne DNK, izolirane iz vzorcev mikrobne biomase iz pretočnega bioreaktorja, začetna oligonukleotida F968-GC in 1401r bolj primerna kot začetna oligonukleotida GC-Eub338f in 534R.
- Ugotovili smo, da nonilfenol vpliva na strukturo mikrobne združbe tako, da jo spremeni. Tako spremenjena struktura mikrobne združbe ostane konstantna ves čas, ko dodajamo nonilfenol.
- Dodatek acetona bistveno ne spremeni mikrobne združbe glede na združbo od dodajanju zgolj acetata in nitrata, sploh ne v daljšem obdobju. Spremembo združbe po dodatku nonilfenola lahko zato pripišemo samo nonilfenolu.
- Najbolj zastopani bakterijski skupini, ki smo ju uspeli identificirati sodita med alfa in beta proteobakterije, kar se sklada z literaturnimi podatki.
- Glede na DGGE analizo vzorca nonilfenol 3 lahko rečemo, da so največji delež bakterij v vzorcu pritrjene biomase predstavljale bakterije, ki so najbolj sorodne vrsti *Xanthobacter flavus*. Glede na DGGE analizo, predstavljajo velik delež bakterij v vzorcu nonilfenol 3 še bakterije sorodne vrsti *Cellulomonas parahominis* oz. *Cellulomonas hominis*, kar se tudi sklada z literaturnimi navedki.

# 6 POVZETEK

Nonilfenol vpliva na mnoge organizme, se akumulira v sedimentih in je potencialno nevaren tudi za človeka ker lahko z nonilfenolom onesnažene vode zaidejo v podtalnico zato ga moramo iz okolja odstranjevati. Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti ali in kako nonilfenol vpliva na pritrjeno mikrobno združbo v pretočnem bioreaktorju. Pri tem smo uporabili predvsem molekularne metode (izolacija skupne mikrobne DNA, pomnoževanje ribosomskih genov z verižno reakcijo s polimerazo, poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu, molekularno kloniranje in sekvenciranje), s katerimi smo poskušali pridobiti neposreden vpogled v strukturo mikrobne združbe v pretočnem bioreaktorju, v katerem potekalo odstranjevanje nonilfenola in v spremembe v strukturi mikrobne združbe, ki naj bi jih povzročil nonilfenol.

Skupno mikrobno DNK smo iz vzorcev izolirali z ultrazvočnim dezintegratorjem, pomnožili del odseka gena za 16S rRNK z začetnima oligonukleotidoma F968-GC in 1401r. Pomnožke PCR smo nato ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v gradientu denaturanta. Opazili smo očiten vpliv nonilfenola na strukturo mikrobne združbe, in sicer se je po dodatku nonilfenola struktura mikrobne združbe jasno spremenila, se stabilizirala in ostala konstantna ves čas dodajanja nonilfenola.

Iz izolirane skupne mikrobne DNK iz vzorca nonilfenol 3 smo z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili del gena za 16S rRNK z začetnima oligonukleotidoma fD1 in 1401r, jih vstavili v vektor za kloniranje, ter z njimi transformirali v bakterije *E. coli* TOP 10. Po selekciji klonov smo izolirali plazmide z vključki, ponovili DGGE analizo in izbrali reprezentativnih 20 klonov za sekvenčno analizo.

Rezultati pridobljeni z iskalnima algoritmoma FASTA 3 in Blast so podobni rezultatom dobljenim z orodjem Classifier s spletne baze podatkov RDP. Razlike med rezultati se pojavljajo pri sekvencah, ki izkazujejo nizko podobnost že znanim vrstam (možnost himernih sekvenc) in tudi pri nekaterih sekvencah na nižjih taksonomskih nivojih. Prav tako se filogenetska drevesa ujemajo z rezultati analize z orodji FASTA 3 in Blast.

Od devetnajstih sekvenc se je za 14 sekvenc izkazalo, da pripadajo mikroorganizmom, ki spadajo med proteobakterije, od tega 10 med  $\alpha$ -proteobakterije in 4 med  $\beta$ -proteobakterije. Tri sekvence so se uvrstile med verukomikrobije, ena v firmikute in ena med aktinobakterije. Za himere so se izkazale tri sekvence. Vse sekvence, ki so se uvrstile med  $\alpha$ -proteobakterije so spadale v družino *Hyphomicrobiaceae*, od tega jih je bilo osem najpodobnejših sekvencam iz vrste X. flavus. Vse sekvence, ki so se uvrstile med  $\beta$ proteobakterije so spadale v družino Rhodocyclaceae, dve od tega v rod Propionivibrio, ena v rod Rhodocyclus in ena v rod Ferribacterium. Od tega dve sekvenci najverjetneje pripadata vrstam P. limicola in P. dicarboxylicus, dve pa najverjetneje v rodova Ferribacterium in Rhodocyclus. Vse tri sekvence, ki so se uvrstile med verukomikrobije, so se uvrstile med t.i. neuvrščene Xiphinematobacteriaceae in so bila najpodobnejše sekvencam še neuvrščenih spartobakterij. Sekvenca, ki se je uvrstila med firmikute, se je uvrstila med neuvrščene velionele in je bila najpodobnejša sekvenci vrste Anaeroarcus burkinensis. Sekvenca, ki se je uvrstila med aktinobakterije, se je uvrstila v družino Cellulomonadaceae in rod Cellulomonas, ter bila najpodobnejša sekvenci vrste C. hominis oz. C. parahominis.

Sekvenčna analiza vzorca nonilfenol 3 nam je pokazala, da sta bili najbolj zastopani skupini, ki smo ju uspeli identificirati, alfa in beta proteobakterije. Ti dve skupini bi lahko bili odgovorni za razgradnjo nonilfenola glede na primerjalne literaturne podatke. DGGE analiza vseh vzorcev je pokazala, da se je povečal delež bakterij, ki so najpodobnejše vrsti *Xanthobacter flavus* in vrsti *Cellulomonas parahominis* oz. *Cellulomonas hominis*. Da bi lahko z zagotovostjo trdili, delež katerih bakterij se je povečal ali zmanjšal med dodajanjem nonilfenola, bi morali nadaljevati z raziskovalnim delom. In sicer bi lahko v nadaljevanju izvedli PCR v realnem času (real time PCR) z vzorci pred in po dodatku nonilfenola s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za posamezne identificirane bakterijske vrste. Da bi lahko ugotovili ali katera od identificiranih bakterij razgrajuje nonilfenol, pa bi morali selektivno izolirati te bakterije iz vzorca, jih nagojiti v čisti kulturi in opraviti ustrezne analize.

# 7 VIRI

ARSO. 2005. Program zmanjševanja onesnaženja z nonilfenoli, operativni program zmanjševanja onesnaževanja površinskih voda s prednostnimi in drugimi nevarnimi snovmi, implementacija 7. člena direktive 76/464/EGS o onesnaževanju pri odvajanju pri nekaterih nevarnih snovi v vodno okolje Evropske skupnosti. Ljubljana, ARSO – Agencija Republike Slovenije za okolje.

<u>http://www.arso.gov.si/podro~cja/vode/programi/operativniprogram\_povrsinske\_vode</u> <u>NS.pdf</u> (december 2006): 83 str.

- Ahel M., Giger W. 1993. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyetoxylates between water and organic solvents. Chemosphere, 26: 1471-1478
- Ahel M., Schaffner C., Gieger W. 1996. Behaviour of alkylphenol polyetoxylates surfactants in the aquatic environment III. Water Research, 30: 37-46
- Agrese E., Macronimi A., Miana P., Bettiol C., Pergin G. 1994. Submitochondrial particle response to linear alkylbenzene sulfonates, nonylphenol polyethoxylates and their biodegradation derivates. Environmental Toxicology and Chemistry, 13: 737-742
- APE Research Council. 2001. Alkylphenols and alkylphenol ethoxylates: highlights of environmental safety. Washington, Alkylphenol and Alkylphenol Ethoxylates Research Council.

http://www.aperc.org/docs/bulletin06-01.htm (oktober 2007): 1 str.

Baena S., Fardeau M.L., Woo T.H.S., Ollivier B., Labat M., Partel B.K.C. 1999. Phylogenetic relationships of three amino-acid-utilizing anaerobes, *Selenomonas acidaminovorans*, '*Selenomonas acidaminophilum*', as inferred from partial 16S rDNA nucleotide sequences and proposal of *Thermanaerovibrio acidaminovorans* gen. nov., comb. nov. and *Anaeromusa acidaminophila* gen. nov., comb. nov.. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 969-974

- Bennet E.R., Metcalfe C.D. 1998. Distribution of alkylphenols in Great Lakes sediments, United States and Canada. Environmental Toxicology and Chemistry, 17: 1230-1235
- Bennie D. T., 1999. Review of the environmental occurance of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. Water Quality Research Journal of Canada, 34: 79-122
- Bennie D. T., Sullivan C.A., Lee H.B., Peart T.E., Maguire R.J. 1997. Occurence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin in the upper St. Lawrence river. Science of the Total Environment, 193: 263-275
- Berryman D., Houde F., DeBlois C., O'Shea M. 2004. Nonylphenolic compounds in drinking water and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health. Chemosphere 56: 247-255
- Bicknell R.J., Herbison A.E., Sumpter J.P. 1995. Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract, but not the brain of rodents. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 54: 7-9
- Blackburn M.A., Waldock M.J. 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. Water Research, 29: 1623-1629
- Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. 2005. Taxonomic outline of the archaea and bacteria.
  V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed. Vol.2, part A. Garrity G.M. (ed.). Berlin, Springer: 1256 str.
- Canadian Council of Ministers of the Environment, 2005. Canadian soil quality guidelines, nonylphenol and its ethoxylates. Winnipeg, Canadian Council of Ministers of the Environment.

http://www.ec.gc.ca/ceqg-rcqe/English/Pdf/GAAG\_NPE\_SoQG\_e.pdf (januar 2008): 2 str.

- Chang B.V., Chiang B.W., Yuan S.Y. 2007. Biodegradation of nonylphenol in soil. Chemosphere, 66: 1857-1862
- Comber M.H.I., Williams T.D., Stewart K.M. 1993. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. Water Research, 27: 273-276
- Cox C. 2003. Nonylphenol and related chemicals. Journal of Pesticide Reform, 16: 15-20.
- CSTEE. 1999. Opinion on human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods. Bilthoven, Working Group on Scientific Commitee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment <a href="http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sct/out37\_en.pdf">http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sct/out37\_en.pdf</a> (november 2007): 96 str.
- Dachs J., Van Ry D., Eisenreich S. 1999. Occurence of estrogenic nonylphenols in the urban and costal atmosphere of the lower Hudson river estuary. Environmental Science & Technology, 33: 2676-2679
- Dizer H., Fischer B., Sepulveda L., Loffredo E., Senesi N., Santana F., Hansen P.D. 2002. Estrogenic effect of leachates and reference endocrine disrupters. Environmental Toxicology, 17: 105-112
- Doronina N. V., Trotsenko Y. A. 2003. Reclassification of 'Blastobacter viscosus' 7d and 'Blastobacter aminooxidans' 14a as Xanthobacter viscosus sp. nov. and Xanthobacter aminooxidans sp. nov.. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 179-182
- Ejlertsson J., Nilsson M.L., Kylin H., Bergman A., Karlson L., Öquist M., Svensson B.H. 1999. Anaerobic degradation of nonylphenol mono- and diethox- ylates in digester sludge, landfill municipal solid waste and landfill sludge. Environmental Science & Technology, 33: 301-306

- Ekelund R., Bergman A., Granmo A., Berggren M. 1990. Bioaccumulation of 4nonylphenol in marine animals a re-evaluation. Environmental Pollution, 64: 107-120
- Environdesic. 2000. Nonylphenol surfactants found in beluga whales. Ontario, Environdesic

http://www.ecogent.ca/enviro/env\_npe.htm (november 2007): 1 str.

- Evropski parlament in Svet Evropske unije. 2003. Šestindvajseta sprememba Direktive Sveta 76/769/EGS v zvezi z omejitvami pri trženju in uporabi nekaterih nevarnih snovi in pripravkov (nonilfenol, nonilfenoletoksilat in cement). Uradni list Evropske unije, 178: 24-27
- Ferrara F., Fabietti F., Delise M., Piccioli-Bocca A., Funari E. 2001. Alkylphenolic compounds in edible molluscs of the Adriatic sea (Italy). Environmental Science & Technology, 35: 3109-3112
- Fent K. 1995. Endocrinically active substances in the environment: State of art. V: Endocrinically active chemicals in the environment. Proceedings, March 9-10, 1995, Berlin, Germany. Gies A. (ed.). Berlin, Umweltbundesamt: 1-151
- Funke G., Ramos C.P. 1995. Identification of some clinical strains of CDC coryneform group A-3 and A-4 bacteria as *Cellulomonas* species and some group A-3 strains. Journal of Clinical Microbiology, 33: 2091-2097
- Ginige M.P., Keller J., Blackall L.L. 2005. Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. Applied and Environmental Microbiology, 71: 8683-8691
- Guenther K., Heinke V., Thiele B., Kleist E., Prast H., Raecker T. 2002. Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. Environmental Science & Technology, 36: 1676-1680

- Harms H. H. 1992. *In vitro* systems for studying phytotoxicty and metabolic fate of pesticides and xenobiotics in plants. Pesticide Science, 35: 277-281
- Hesselsøe M., Jensen D., Skals K., Olesen T., Møldrup P., Roslev P., Mortensen G.K., Henriksen K. 2001. Degradation of 4-nonylphenol in homogeneus and nonhomogeneus mixtures of soil and sewage sludge. Environmental Science & Technology, 35: 3695-3700
- Hoponick J. 2005. Nonylphenol ethoxylates: a safer alternative exist to this toxic cleaning agent. California, Sierra Club. (November 2005) <u>http://sierraclub.org/toxics/nonylphenol\_ethoxylates3.pdf</u> (oktober 2006): 1-11
- Hseu Z.-Y. 2006. Response of microbial activities in two contrasting soils to 4nonylphenol treated with biosolids. Chemosphere, 64: 1769-1776
- Ike M., Asano M., Belkada F.D., Tsunoi S., Tanaka M., Fujita M. 2002. Degradation of biotransformation product of nonylphenol ethoxylates by ozonation and UV/TiO2 treatment. Water Science & Technology, 46:127-132
- Jobling S. J., Sumpter J. P. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: *in vitro* study using rainbow trout hepatocytes. Aquatic Toxicology, 27: 361-372
- Jontofson M., Stoffels M., Hartmann A., Pfiser G., Jüttner I., Severin-Edman G., Schramm K.W., Schloter M. 2002. Influence of nonylphenol on the microbial community of lake sediments in microcosms. Science of the Total Environment, 285: 3-10
- Karley A.J., Powell S.I., Davies J.M. 1997. Effect of nonylphenol on growth of *Neurospora crassa* and *Candida albicans*. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1312-1317

- Keith T.L., Snyder S.A., Naylor C.G., Staples C.A., Summer C., Kannan K., Giesy J.P.
  2001. Identification and quantification of nonylphenol ethoxylates and nonylphenol in fish tissues from Michigan. Environmental Science & Technology, 35: 10-13
- Kollmann A., Brault A., Touton I., Dulsoca J., Chaplain V., Mougin C. 2003. Effect of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils. Journal of Environmental Qualitiy, 32: 1269-1276
- Kolpin D., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewaters contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environmental Science & Technology, 36: 1202-1211
- Kuch H., Ballschmiter K. 2001. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environmental Science & Technology, 35: 3201-3206
- Kudo C., Wada K., Masuda T., Yonemura T., Shibuya A., Fujimoto Y., Nakajima A., Niwa H., Kamisaki Y. 2004. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of caspase cascade and regulation of the cell cycle. Journal of Neurochemistry, 88: 1416-1423
- Kyselova V., Peknicova J., Buckiova D., Boubelik M. 2003. Effects of nonylphenol and resveratol on body and organ weight and *in vivo* fertility of outbread CD-I mice. Reproductive Biology and Endocrinology, 1: 30-39
- Lozada M., Itria R.F., Fiugerola E.L.M., Babay P.A., Gettar R.T., de Tullio L.A., Erijman L. 2004. Bacterial community shifts in nonylphenol polyethoxylates-enriched activated sludge. Water Research, 38: 2077-2087
- Lee P.C. 1998. Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogens, nonylphenol, to male newborn rats. Endocrine, 9: 105-111

- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., Cooper D.W., Jones D.M. 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from U.K. Tyne and Tees estuaries. Environmental Science & Technology, 33: 1009-1014
- Macronimi A., Pavoni B., Sfriso A., Orio A.A. 1990. Persistent metabolites of alkylphenol polyethoxylates in the marine environment. Marine Chemistry, 29: 307-323
- Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. New Jersy, Pearson Education Inc.: 1019 str.
- Matsumura N., Ishibashi H., Hirano M., Nagao Y., Watanabe N., Shiratsuchi H., Kai T., Nishimura T., Kashiwagi A., Arizono K. 2005. Effects of nonylphenol and triclosan on production of plasma vitellogenin and testosterone in male south african clawed frogs (*Xenopus laevis*). Biological & Pharmaceutical Bulletin, 28, 9: 1748-1751
- McLeese D. W., Zitko V., Sergeant D.B., Burridge L., Metcalfe C.D. 1981. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. Chemosphere, 10: 723-730
- Michelangeli F., Orlowski S., Champeil P., East J.M., Lee A.G. 1990. Mechanism of inhibition of the (Ca2(+)-Mg2+) ATPase by nonylphenol. Biochemistry, 29: 3091-3101
- Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 2: 371-322
- Muyzer G., De Wall E.C., Uitterliden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturating gel electophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified gene coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59, 3:695-700

- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturating gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, 73: 127-141
- Quattara A. S., Traore A.S., Garcia J.L. 1992. Characterisation of Anaerovibrio burkinabensis sp. nov., a lactate-fermenting bacterium isolated from rice field soils. International Journal of Systematic Bacteriology, 42: 390-397
- Porter N.J., Hayden N.J.. 2002. Nonylphenol in the environment: a critical review. Burlington, Universisty of Vermont. (2002) <u>http://www.emba.uvm.edu/~nhayden/npreview.pdf</u> (december 2007): 37 str.
- Potter A., Simmons K., Wu J., Sanchez-Olvera M., Kostecki P., Calabrese E. 1999. Static die-away of a nonylphenol ethoxylate surfactant in estuarine water samples. Environmental Science & Technology, 33: 113-118
- Prasad R. 1989. Effects of nonylphenol adjuvant on macrophytes. V: Adjuvants and agrochemicals. First International Symposium, avgust 5-7, 1989, Manitoba, Canada. Chow, vol.1, chapter 6: Mode of action and physiological activity. P.N.P. (eds.). Boca Raton FL, CRC press: 1-207
- Recchia A.G., Vivaqua A., Gabriele S., Carpino A., Fasanella G., Rago V., Bonofiglio D., Maggiolini M. 2004. Xenoestrogens and the induction of proliferative effects in breast cancer cells via direct activation of oestrogen resceptor alpha. Food Additives & Contaminants, 21: 134-144
- Rudel R.A., Melly S.J., Geno P.W., Sun G., Brody J.G. 1998. Identification of alkylphenols and other estrogenic phenolic compounds in wastewater, septage, and groundwater on Cape Cod, Massachusetts. Environmental Science & Technology, 32: 861-869

- Sangwan P., Chen X., Hugenholtz P., Janssen P.H. 2004. *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. Applied and Environmental Microbiology, 70: 5875-5881
- Satokari R.M., Vaughan E.E., Akkermans A.D.L., Saarela M., de Vos W.M. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus – specific PCR and denaturating gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 67: 504-513
- Scruggs C., Hunter G., Snyder E., Long B., Snyder S. 2005. EDCs in wastewater: What's the next step?. Water Environment & Technology, 3: 24-31
- Sieke N., Waniburchi H., Morimura K., Wei M., Nishikawa T., Hirata K., Yoshikawa J., Fukushima S. 2003. Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carciogenesis model. Cancer Letters, 192: 25-36
- Sierra Club. 2007. Groups Demand EPA Action on Gender-Bending Chemicals. Washington, Sierra Club <u>http://www.sierraclub.org/pressroom/releases/pr2007-06-05.asp</u> (december 2007): 2 str.
- Sigma Chemical Co., Aldrich Chemical Co., Fluka Chemical Co. 1993. Material safety data sheet; nonylphenol, tech.. Sigma Chemocal Co., Aldrich Chemical Co., Fluka Chemical Co., St. Louis MO, Milwaukee WI, Ronkonkoma NY. <u>http://www2.itap.purdue.edu/msds/docs/8390.pdf</u> (oktober 2007): 3 str.
- Snyder S., Keith T.L., Verbruge D.A., Snyder E.M., Gross T.S., Kannan K., Giesy J.P. 1999. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures. Environmental Science & Technology, 33: 2814-2820

- Soares A., Murto M., Guieysse B., Mattiasson B. 2006. Biodegradation of nonylphenol in a continuous bioreactor at low temperatures and effects on the microbial population. Applied Microbiology and Biotechnology, 69: 597-606
- Soares A., Guieysse B., Mattiasson B. 2003. Biodegradation of nonylphenol in a continuous packed-bed bioreactror. Biotechnology Letters, 25: 927-933
- Soto A.M., Sonnenschein G., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N., Serrano F.O. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. Environmental Health Perspectives, 103: 113-122
- Thompson J.R., Marcelino L.A., Polz M.F. 2002. Heteroduplexes in mixed template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. Nucleic Acids Research, 30: 2083-2088
- Van Ry D., Dachs J., Gigliotti C.L., Brunciak P.A., Nelson E.D., Eisenreich S.J. 2000. Atmospheric seasonal trends and environmental fate of alkylphenols in the lower Hudson river estuary. Environmental Science & Technology, 34: 2410-2417
- Vikelsøe J., Thomsen M., Carlsen L. 2002. Phtalates and nonylphenols in profiles of differently dressed soils. Science of the Total Environment, 296: 105-116
- Vivacqua A., Recchia A.G., Fasanella G., Gabriele S., Carpino A., Rago V., Di Gioia M.L., Leggio A., Bonofiglio D., Liguori A., Maggiolini M. 2003. The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. Endocrine, 22: 275-284
- Wada K., Sakamoto H., Nishikawa K., Sakuma S., Nakajima A., Fujimoto Y., Kamisaki Y. 2007. Life style-related diseases of the digestive system: endocrine disruptors stimulate lipid accumulation in target cells related to metabolic syndrome. Journal of Pharmacological Sciences, 105: 133-137

- Wang G.C., Wang Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR amplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. Applied Microbiology and Biotechnology, 63: 4645-4650
- Weinburger P., deChacin C., Czuba M. 1987. Effects of nonylphenol, a pesticide surfactant, on some metabolic process of *Chlamydomonas segnis*. Canadian Journal of Botany, 65: 696-702
- Weinberger P., Vladut R. 1981. Comparative toxic effects of some xenobiotics on germination and early seeding growth of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) and white birch (*Betula papyrifera* March.). Canadian Journal of Forest Research, 11: 796-804
- White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., Parker M.G. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. Endocrinology, 135: 175-182

# ZAHVALA

Rada bi se zahvalila vsem, ki so pomagali pri nastanku te diplomske naloge. Še posebej bi se rada zahvalila:

Mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za nadzor in produktivne nasvete tekom nastajanja tega dela.

Somentorju dr. Janezu Vrtovšku za postavitev in zagon reaktorja, ter opravljene kemijske meritve.

Dr. Darji Ferme za pomoč in nasvete pri izvedbi eksperimenta.

Celotnemu kolektivu Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko v Domžalah za pomoč in prijaznost.

Prof. dr. Davidu Stoparju za hitro in konstruktivno recenzijo.

Staršema Mariji in Marijanu za potrpežljivost in vso podporo med mojim študijem.

Marku za vso ljubezen, podporo in pomoč.

Levinu in Petri za iskreno prijateljstvo in vse lepe trenutke med študijem.

# PRILOGE

**Priloge A**: Sekvence pridobljene s sekvenčno analizo klonov iz vzorca nonilfenol 3, katerim sledijo rezultati iskanja najpodobnejših sekvenc v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast z dne 9.11.2008. V algoritmih smo uporabili sekvence, ki ne vsebujejo mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r (v sekvencah kot male tiskane črke).

# Priloga A1: Sekvenca 2 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 2

### Dolžina sekvence: 1336 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1300 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
EF019990	Uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium clone	89,2	89,2	1302
	Elev_16S_1377			
EU409113	Uncultured bacterium clone DBS-63	89,7	89,9	1289
EU835473	Uncultured bacterium clone 3B03	88,9	88,9	1301
EU835471	Uncultured bacterium clone 3B01	88,9	88,9	1301
EU881321	Uncultured bacterium clone KMS200711-147	88,5	88,5	1301
EF018453	Uncultured proteobacterium clone Amb_16S_1078	88,3	88,3	1302
AB255069	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: IC-55	88,4	88,4	1303
EF018209	Uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium clone	88,1	88,1	1304
	Amb_16S_556			
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	88,2	88,2	1302
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	88,2	88,2	1302

Accession	Description	<u>Ouery</u>	Max
		coverage	<u>ident</u>
EF589969.2	Uncultured bacterium clone D07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	86%	93%
<u>Y17601.1</u>	Propionivibrio dicarboxylicus 16S rRNA gene, partial	86%	93%
AF016690.1	Propionibacter pelophilus 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	86%	93%
EU409113.1	Uncultured bacterium clone DBS-63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	90%
EF019990.1	Uncultured Hyphomicrobiaceae bacterium clone Elev_16S_1377 16S ribosomal RNA	99%	89%
	gene, partial sequence		
EU835473.1	Uncultured bacterium clone 3B03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	89%
EU835471.1	Uncultured bacterium clone 3B01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	89%
<u>AB255069.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: IC-55	100%	88%
EF018453.1	Uncultured proteobacterium clone Amb_16S_1078 16S ribosomal RNA gene, partial	99%	88%
	sequence		
<u>AY507137.1</u>	Uncultured bacterium clone D10-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	89%

# Priloga A2: Sekvenca 3 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca3

X942061

## Dolžina sekvence: 1335 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1298 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	99,4	99,4	1298
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	99,4	99,4	1298
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	99,4	99,4	1298
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	99,4	99,4	1298
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	99,4	99,4	1298
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99,4	99,4	1291
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99,4	99,4	1291
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA	99,2	99,2	1299
X94205	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	99,3	99,3	1291
X94206	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	99,3	99,3	1291

Max ident

99% 99% 99% 99% 99% 99%

99%

99%

rage

99%

99%

Blast:		
Accession	Description	Query cove
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%
AJ536689.1	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%
AJ536687.1	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%
AJ224614.1	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%
<u>X94204.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99%
AY561848.1	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%

X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)

X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)

# Priloga A3: Sekvenca 5 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 5

EACTA 2.

### Dolžina sekvence: 1317 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1300 nt

FASIA 3.				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	99,5	99,5	1196
AJ539988	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	99,5	99,5	1196
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	99,5	99,5	1196
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	99,5	99,5	1196
AJ313028	Xanthobacter sp. MN 45.1 16S rRNA gene	99,5	99,5	1196
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99,5	99,5	1196
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99,5	99,5	1196
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	99,5	99,5	1196
AY436816	Xanthobacter sp. EP1	99,4	99,4	1196
X94205	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	99,4	99,4	1196
				1

Accession	Description	Query coverage	Max ident
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	99%
AJ536689.1	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	92%	99%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	92%	99%
AJ536687.1	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	92%	99%
AJ224614.1	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	92%	99%
AJ313028.1	Xanthobacter sp. MN 45.1 16S rRNA gene, isolate MN 45.1	92%	99%
X94204.1	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	92%	99%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	92%	99%
AY436816.1	Xanthobacter sp. EP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	99%
X94206.1	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	92%	99%

# **Priloga A4**: Sekvenca 6 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 6

# Dolžina sekvence: 1335 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1298 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
DQ533878	Xanthobacter flavus strain WM2814	99,7	99,7	1298
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	98,9	98,9	1298
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRBacterium RBS3-84 16S rRNA	98,9	98,9	1298
AJ536687	gene NA gene	98,9	98,9	1298
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	98,9	98,9	1298
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	98,9	98,9	1291
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	98,9	98,9	1291
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15	98,7	98,7	1291
X94205	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	98,8	98,8	1291
		1	1	1

Accession	Description	<b>Query coverage</b>	Max ident
DQ533878.1	Xanthobacter flavus strain WM2814 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
AJ536689.1	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536687.1	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%	98%
<u>AJ224614.1</u>	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%	98%
<u>X94204.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99%	98%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99%	98%
AY561848.1	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
X94206.1	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	99%	98%

# **Priloga A5**: Sekvenca 8 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 8

agagtttgatcctggctcagAACGAACGCTGGCGCGTGGATAAGACATGCAAGTCGAACGGGATTAGTTTTGTAGCAATACGAAGCTGTC ${\tt TAGTGGCGCACGGGTGCGTAACACGTGAGTAATCTGCCGAAAAGTGGGGGGATAGCTCGCCGAAAGGCGAATTAATACCGCATGTGACTACT$  ${\tt CCTTGATTAAGGGGGGATGTTAAAGTAGCAATACGCTTTTTGATGAACTCGCGGGCCTATCAGCTAGATGGCGGGGTAACGGCCCACCATGGC$ TATGACGGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACACCTACGGGTGGCAGCAGTCGAGAATTTT TCACAATGGGGGAAACCCTGATGGAGCGACGCCGCGTGGAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTCCTGTCATGCGGGAACAAGAAAGTG  ${\tt AAGGGTGCGTAGGTGGCGATGCAAGTCTGGTGTGAAATCTCAGGGCTTAACCTTGAAAATGCACCGGATACTGCGTTGCTTGAGGATTGTA$ GAGGAGAGTGGAATTCACGGTGTAGCAGTGAAAATGCGTAGATATCGTGAGGAAGACCAGTTGCGAAGGCGACTCTCTGGGCAACTCCTGGGCAACTCCTGAG  ${\tt ACTGAGGCACGAAGGCTAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTAGCAGTAAACGGTGCACGTTTGGTGTGGGCGGGTTCAG$  ${\tt ACCCCGTCCGTGCCGAGCTAACGCGTTAAACGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGC$  ${\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt C} {\tt A} {\tt C} {\tt G} {\tt G$ GTTGGTAGCAATATCAACGCTTTGCACAGGTGCTGCATGGCAGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGC AACCCCTGTGTCCAGTTGCCCGAAAGGGATCTCTGGACAGACTGCCCTGTGAAACGGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGTATGG  ${\tt CCCTTACGGCCAGGGCTGCACACGTACTACAATGCCCAGTACAGAATGAACCGAATCCGCAGGTGGAGGAAATCTCAAAAACTGGGCCCA$  ${\tt GTTCGGATTGGAGGCTGCAACTCGCCTCCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATGGCGCATCAGCATTTGGTGCCGTGAATACGTTCCCgggt$ cttgtacacacgc

## Dolžina sekvence: 1378 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1341 nt

### FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AB369162	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA,clone:CK06-	99,3	99,3	1342
	06_Mud_MAS1B-05.			
EU131037	Uncultured bacterium clone SIP CM23	93,8	93,8	1342
AJ863245	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	93,7	93,7	1342
AB245341	Spartobacteria bacterium Gsoil 133	93,6	93,6	1342
AB245342	Spartobacteria bacterium Gsoil 144	93,6	93,6	1342
EU344928	Uncultured bacterium clone Hg5-18	94,0	94,0	1347
AJ863244	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	93,5	93,5	1342
DQ415853	Uncultured bacterium clone zEL61	91,7	91,7	1343
AY752101	Uncultured lake bacterium P38.38	92,4	92,4	1352
EF520637	Uncultured Verrucomicrobiae bacterium clone ADK-HDh02-03	98,2	98,2	1350

Accession	Description	Query	<u>Max</u> ident
A D260162 1	Unaultured heaterium care for 165 rDNA partial sequence along CV06	100%	
<u>AB309102.1</u>	06 Mud MAS1B-05	100%	9970
EU344928.1	Uncultured bacterium clone Hg5-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	94%
EU131037.1	Uncultured bacterium clone SIP CM23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	94%
AB245342.1	Spartobacteria bacterium Gsoil 144 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	93%
AB245341.1	Spartobacteria bacterium Gsoil 133 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	93%
AJ863245.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	100%	93%
AJ863244.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	100%	93%
DQ415853.1	Uncultured bacterium clone zEL61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	92%
<u>AY752101.1</u>	Uncultured lake bacterium P38.38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	92%
<u>AY752089.1</u>	Uncultured lake bacterium P38.12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	92%

# **Priloga A6**: Sekvenca 9 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 9

# Dolžina sekvence: 1333 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1296 nt

### FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
EU864470	Uncultured bacterium clone E46	97,1	97,1	1296
EU919762	Uncultured bacterium clone b19	96,8	96,8	1295
DQ404891	Uncultured bacterium clone 654963	96,8	96,8	1297
AF288301	Alpha proteobacterium 34619 16S ribosomal RNA gene	96,6	96,6	1296
AF236000	Alpha proteobacterium F0723	96,6	96,6	1296
AF007948	Rasbo bacterium 16S ribosomal RNA gene	95,7	95,7	1296
EF648045	Uncultured Rhodomicrobium sp. clone HB35	95,4	95,4	1296
EU341145	Uncultured Rhizobium sp. clone AV_2N-E09	95,7	95,7	1300
AF273081	Bosea minatitlanensis 16S ribosomal RNA gene	93,7	93,7	1303
AJ536690	Bacterium RRP-E4 16S rRNA gene	93,4	93,4	1303

Blast:			
Accession	Description	Query	Max
		coverage	<u>ident</u>
EU864470.1	Uncultured bacterium clone E46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
DQ404891.1	Uncultured bacterium clone 654963 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%
EU919762.1	Uncultured bacterium clone b19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF288301.1	Alpha proteobacterium 34619 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%
AF236000.1	Alpha proteobacterium F0723 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%
EU341145.1	Uncultured Rhizobium sp. clone AV_2N-E09 16S ribosomal RNA gene, partial	99%	95%
	sequence		
AF007948.1	Rasbo bacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	95%
EF648045.1	Uncultured Rhodomicrobium sp. clone HB35 16S ribosomal RNA gene, partial	100%	95%
	sequence		
AF273081.1	Bosea minatitlanensis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	93%
EU861833.1	Uncultured soil bacterium clone B12_bac_con 16S ribosomal RNA gene, partial	99%	93%
	sequence		

# **Priloga A7**: Sekvenca 10 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 10

agagtttgatcctggctcagAACGAACGCTGGCGCGTGGATAAGACATGCAAGTCGAACGGGATTAGTTTTGTAGCAATACGAAGCTGGT ${\tt CCAGTGGCGCACGGGTGCGTAACACGTGAGTAATCTGCCGAGAAGTGGGGGATAGCTCGCCGAAAGGCGAATTAATACCGCATGTGACTAC$ CTCTTGATTAAGGGGGGATGTTAAAGTAGCAATACGCTTTTTGATGAACTCGCGGCCTATCAGCTAGATGGCGGGGTAACGGCCCACCATGG GATAGTACCGCAAGAGGAAGAGACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGTCTCAAGCGTTGTTCGGATTCATTGGGCGT AAAGGGTGCGTAGGTGGCGATGCAAGTCTGGTGTGAAATCTCAGGGCTTAACCTTGAAAATGCACCGGATACTGCGTTGCTTGAGGATTGT AGAGGAGAGTGGAATTCACGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATCGTGAGGAAGACCAGTTGCGAAGGCGACTCTCTGGGCAACTCCTGA  ${\tt CACTGAGGCACGAAGGCTAGGGGGGGGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTAGCAGTAAACGGTGCACGTTTGGTGTGGGCGGGTTCA$ GACCCCGTCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAACGTGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG  ${\tt CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCTTTGACATGGCAGGACGACTTCCGGAGACGGATTT$  ${\tt CTCGCCTCTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCGAGTCCTCA$  ${\tt TGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGATGCGAAAGGGCGACCTTTAGCAAAATCTCAAAAAGCCGTC$  ${\tt TCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCggg$ tettgtacacacge

# Dolžina sekvence: 1379 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1342 nt

### FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AB369162	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: CK06-	91,2	91,2	1350
	06_Mud_MAS1B-05.			
AJ863245	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	87,4	87,4	1349
AB245341	Spartobacteria bacterium Gsoil 133	87,5	87,5	1350
AB245342	Spartobacteria bacterium Gsoil 144	87,6	87,6	1350
AJ863244	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	97,1	97,1	1349
EU131037	Uncultured bacterium clone SIP CM23	86,5	86,5	1349
DQ415853	Uncultured bacterium clone zEL61	85,4	85,4	1348
AY752110	Uncultured lake bacterium P38.59	87,3	87,3	1253
EU135536	Uncultured bacterium clone FFCH986Uncultured bacterium	84,9	84,9	1335
AJ289983	FukuN106 16S rRNA gene 1	84,2	84,1	1347

Accession	Description	Query coverage	<u>Max</u> ident
<u>AB369162.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: CK06- 06 Mud MAS1B-05	100%	91%
AB245342.1	Spartobacteria bacterium Gsoil 144 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	88%
<u>AB245341.1</u>	Spartobacteria bacterium Gsoil 133 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	88%
AJ863245.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	100%	88%
AJ863244.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	100%	87%
EU344928.1	Uncultured bacterium clone Hg5-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	87%
EU131037.1	Uncultured bacterium clone SIP CM23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	87%
<u>AY752110.1</u>	Uncultured lake bacterium P38.59 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	88%
EU135490.1	Uncultured bacterium clone FFCH12047 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	86%
DQ415853.1	Uncultured bacterium clone zEL61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	86%

# **Priloga A8**: Sekvenca 14 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 14

# Dolžina sekvence: 1335 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1298 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
DQ533878	Xanthobacter flavus strain WM2814	99,7	99,7	1298
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	98,9	98,9	1298
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	98,9	98,9	1291
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	98,9	98,9	1291
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15	98,7	98,7	1299
X94205	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	98,8	98,8	1291

Accession	Description	Query coverage	Max ident
DQ533878.1	Xanthobacter flavus strain WM2814 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>AJ536689.1</u>	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536687.1	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%	98%
<u>AJ224614.1</u>	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%	98%
<u>X94204.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99%	98%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99%	98%
<u>AY561848.1</u>	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
X94206.1	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	99%	98%

# **Priloga A9**: Sekvenca 15 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 15

agagtttgatcctggctcagGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTCTAATGTTTGACACTGAGTCTTTGTGAA ${\tt GGAAACTTCAGGCGTGCCAATGCGCGAAGCGCAGAGGAACGCGAAAGCGAAAGTGGACAACCTAAGCGAAGGTTGAGTGTTAAACATTAGAT$ AGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGATAACCTGCCTCTAAGATGGGGACAACAACTCGAAAGGGTTGCTAATACCGAATGTGAACAGAA  ${\tt CTTCGCATGGAGAGCTGTTTGAAGGTGGCCTCTGAATATGCTACCGCTTAGAGATGGGTCTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGAGGGGTAACG$ GCCCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  ${\tt ACGAATGTGCAGGATGTGAATAATGTCTTGTAATGACGGTACCTGAGGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG$  ${\tt AGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACGATGTCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGTAGTGAACGGGATTAGATACCCCGGTAATCCTGGCC$  ${\tt GTAAACGATGGGTACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTCCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGTACCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA}$ GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGACTT GACATTGAGTGAAAGGCCTAGAGATAGGTCCCTCCCTTCGGGGACACAAAAACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCGTCGTGTGGTGGAGAT  ${\tt GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCCTATGTTGCCAGCATGTAAAGATGGGGACTCATGGGAGACTGCCGTCGACAAGAC$ GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACGTGCTACAATGGCGGTGACAGTGGGATGCAAAGG GGCGACCCCTAGCAAATCTCCCAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGG  ${\tt ATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCgggtcttgtacacacgc}$ 

# Dolžina sekvence: 1501 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1464 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
EU567043	Uncultured Pseudomonas sp. clone TCCC 11092	87,0	87,0	1481
AJ010961	Anaerovibrio burkinabensis DSM 6283(T), 16S rRNA gene	91,2	91,2	1306
AF407698	Uncultured bacterium clone G07	90,9	90,9	1306
AF071415	Anaeromusa acidaminophila 16S ribosomal RNA gene	91,0	91,0	1305
AJ488092	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIIA-2	90,7	90,7	1305
AJ488089	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIB-7	90,7	90,7	1305
AJ229233	Unidentified eubacterium from anoxic bulk soil 16S rRNA gene	89,3	89,3	1348
AJ009494	uncultured bacterium SJA-143 16S rRNA gene, clone SJA-143	90,4	90,4	1308
AF349762	Uncultured bacterium TCE33 16S ribosomal RNA gene	90,6	90,6	1291
EU307103	Uncultured bacterium clone C-u_Lac-1_66	86,0	86,0	1481

Accession	Description	Query	Max
		<u>coverage</u>	ident
AJ010961.1	Anaerovibrio burkinabensis DSM 6283(T), 16S rRNA gene	89%	91%
AF407698.1	Uncultured bacterium clone G07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	91%
AF071415.1	Anaeromusa acidaminophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	89%	91%
AJ488092.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIIA-2	89%	91%
AJ488089.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIB-7	89%	91%
AF349762.2	Uncultured bacterium TCE33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	87%	91%
AJ488080.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IB-27	89%	90%
EU307090.1	Uncultured bacterium clone A_Lac-1_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	91%	100%
FJ269098.1	Iron-reducing bacterium enrichment culture clone HN-HFO71 16S ribosomal RNA	91%	100%
	gene, partial sequence		
AJ009494.1	uncultured bacterium SJA-143 16S rRNA gene, clone SJA-143	91%	100%

# **Priloga A10**: Sekvenca 16 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 16

## Dolžina sekvence: 1212 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1195 nt

### FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AY133076	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs272	99.8	99.8	1153
AY133075	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs296	99,8	99,8	1153
AF529359	Beta proteobacterium AC1 16S ribosomal RNA gene	99,8	99,8	1153
AY133067	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs2105	99,7	99,7	1153
AY133087	Uncultured beta proteobacterium clone ccslm218	99,7	99,7	1153
AF529131	Uncultured beta proteobacterium clone FTLpost11	99,7	99,7	1153
AY133066	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs203	99,7	99,7	1153
AB240471	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: SRRT25	99,7	99,7	1153
AB240504	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: SRRB16	99,6	99,6	1153
Y17060	Ferribacterium limneticum	98,9	98,9	1153

Accession	Description	<b>Query coverage</b>	Max ident
<u>AY133076.1</u>	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs272 16S ribosomal RNA gene	96%	99%
<u>AY133075.1</u>	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs296 16S ribosomal RNA gene	96%	99%
<u>AF529359.1</u>	Beta proteobacterium AC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	99%
<u>AY133087.1</u>	Uncultured beta proteobacterium clone ccslm218 16S ribosomal RNA gene	96%	99%
<u>AY133067.1</u>	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs2105 16S ribosomal RNA gene	96%	99%
<u>AY133066.1</u>	Uncultured Rhodocyclaceae bacterium clone ccs203 16S ribosomal RNA gene	96%	99%
<u>AF529131.1</u>	Uncultured beta proteobacterium clone FTLpost11 16S ribosomal RNA gene	96%	99%
<u>AB240471.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: SRRT25	96%	99%
<u>AB240504.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: SRRB16	96%	99%
EF562548.1	Uncultured beta proteobacterium clone CB_05 16S ribosomal RNA gene	96%	99%
<u>Y17060.1</u>	Ferribacterium limneticum 16S rRNA gene, strain cda-1	96%	99%

# Priloga A11: Sekvenca 20 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 20

# Dolžina sekvence: 1332 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1295 nt

FASTA 3	3:			
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
EU864470	Uncultured bacterium clone E46 16S ribosomal RNA	96,1	96,1	1295
EU919762	Uncultured bacterium clone b19 16S ribosomal RNA	95,7	95,7	1293
DQ404891	Uncultured bacterium clone 654963	95,7	95,7	1296
AF288301	Alpha proteobacterium 34619 16S ribosomal RNA gene	95,5	95,5	1295
AF236000	Alpha proteobacterium F0723	95,5	95,5	1295
AF007948	Rasbo bacterium 16S ribosomal RNA gene	94,8	94,8	1295
EF648045	Uncultured Rhodomicrobium sp. clone HB35	94,7	94,7	1295
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	94,5	94,5	1300
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	94,5	94,5	1300
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	94,5	94,5	1300

Blast:			
Accession	Description	Query	Max
		<u>coverage</u>	<u>ident</u>
EU864470.1	Uncultured bacterium clone E46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
EU919762.1	Uncultured bacterium clone b19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
DQ404891.1	Uncultured bacterium clone 654963 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF288301.1	Alpha proteobacterium 34619 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AF236000.1	Alpha proteobacterium F0723 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
<u>CP000781.1</u>	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	100%	95%
AF007948.1	Rasbo bacterium 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
EF648045.1	Uncultured Rhodomicrobium sp. clone HB35 16S ribosomal RNA gene, partial	99%	95%
	sequence		
EU341145.1	Uncultured Rhizobium sp. clone AV_2N-E09 16S ribosomal RNA gene, partial	99%	94%
	sequence		
<u>X94201.1</u>	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain 7c)	99%	95%
EU982303.1	Xanthobacter autotrophicus strain HYS0201-SM02 16S ribosomal RNA gene, partial	100%	94%
	sequence		
X94203.1	X autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain JW33)	99%	95%
# Priloga A12: Sekvenca 21 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 21

agagtttgatcctggctcagAACGAACGCTGGCGCGCGTGGATAAGACATGCAAGTCGAACGGGATTAGTTTTGTAGCAATACGAAGCTGGT ${\tt CCAGTGGCGCACGGGTGCGTAACACGTGAGTAATCTGCCGAGAAGTGGGGGATAGCTCGCCGAAAGGCGAATTAATACCGCATGTGACTAC$ CTCTTGATTAAGGGGGGATGTTAAAGTAGCAATACGCTTTTTGATGAACTCGCGGCCTATCAGCTAGATGGCGGGGTAACGGCCCACCATGG CTATGACGGGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACACCTACGGGTGGCAGCAGCCGGAGAATTT GATAGTACCGCAAGAGGAAGAGACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGTCTCAAGCGTTGTTCGGATTCATTGGGCGT  ${\tt A} {\tt A} {\tt A} {\tt G} {\tt G$ AGAGGAGAGTGGAATTCACGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGATATCGTGAGGAAGACCAGTTGCGAAGGCGACTCTCTGGGCAACTCCTGA  ${\tt CACTGAGGCACGAAGGCTAGGGGGGGGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTAGCAGTAAACGGTGCACGTTTGGTGTGGGCGGGTTCA$ GACCCCGTCCGTGCCGGAGCTAACGCGTTAAACGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCG  ${\tt CACAAGCGGTGGAGTATGTGGCTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCATTGTCTCCCGGTGAAAGTCGGAT$ AGTTGGTAGCAATATCAACGCTTTGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCGTCGTGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG CAACCCCTGTGTCCTGTTGCCCGAAAGGGATCTCTGGACAGACTGCCCTGTGAAACGGGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAGTATG  ${\tt GCCCTTACGGCCAGGGCTGCACACGTACTACAATGCCCAGTACAGAATGAACCGAATCCGCGAGGTGGAGGAAATCTCAAAAACTGGGCCC$  ${\tt AGTTCGGATTGGAGGCTGCAACTCGCCTCCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATGGCGCATCAGCTACGGCGCCGTGAATACGTTCCCgggt$ cttgtacacacgc

### Dolžina sekvence: 1378 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1341 nt

### FASTA 3:

111011101				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AB369162	Uncultured bacterium gene, clone: CK06-06_Mud_MAS1B-05.	98,9	98,9	1342
EU131037	Uncultured bacterium clone SIP CM23	94,4	94,4	1341
AJ863245	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	94,3	94,3	1341
AJ863244	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	94,1	94,1	1341
AB245341	Spartobacteria bacterium Gsoil 133	93,9	93,9	1341
AB245342	Spartobacteria bacterium Gsoil 144 gene for 16S rRNA	93,9	93,9	1341
EU344928	Uncultured bacterium clone Hg5-18	93,9	93,9	1345
DQ415853	Uncultured bacterium clone zEL61	92,4	92,4	1341
AY752101	Uncultured lake bacterium P38.38	92,8	92,8	1251
AJ289992	Uncultured bacterium FukuN18 16S rRNA gene	89,4	89,4	1350

Accession	Description	<u>Query</u>	Max
		<u>coverage</u>	<u>ident</u>
<u>AB369162.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: CK06-	100%	98%
	06_Mud_MAS1B-05		
EU131037.1	Uncultured bacterium clone SIP CM23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	94%
AJ863245.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	100%	94%
EU344928.1	Uncultured bacterium clone Hg5-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	94%
<u>AJ863244.1</u>	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	100%	94%
<u>AB245342.1</u>	Spartobacteria bacterium Gsoil 144 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	94%
<u>AB245341.1</u>	Spartobacteria bacterium Gsoil 133 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	94%
DQ415853.1	Uncultured bacterium clone zEL61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	92%
AY752101.1	Uncultured lake bacterium P38.38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	93%	93%
<u>AY752089.1</u>	Uncultured lake bacterium P38.12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	93%

# Priloga A13: Sekvenca 29 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 29

 ${\tt GCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCCTGACTCTGGGATAAGCCTTGGAAACGAGGTCTAATACCGGATACGAGACGCTCGGG$ CATCTGAGCGTCTGGAAAGATTTATCGGTCAGGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGACG  ${\tt GGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT$ GGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGT  ${\tt CTCGTAGGCGGTTTGTCGCGTCTGCTGTGAAAACTCGAGGCTCAACCTCGGGCTTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGA$ GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGGCCGCAACTGACGCTGA  ${\tt GGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGCTCATTCCACGAG$ TTCCGTGCCGCAGCAAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAG  ${\tt CGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACTTCCAGAGATGGTTGCCCCCGCA$ AGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCTATG TTGCCAGCGGATCATGCCGGGGACTCATAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCGTCATGCCCCCTTAT  ${\tt GTCTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGG$  ${\tt ATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCCgggtcttgtaca$ cacqc

## Dolžina sekvence: 1370 nt

### Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1333 nt

### FASTA 3:

ID		Source	Identity %	Similarity %	Overlap
DQ816312	Uncultured ba	cterium clone aaa79h04 16S ribosomal RNA gene	99,3	99,3	1334
AY655729	Cellulomonas	parahominis strain W7385	99,0	99,0	1335
AY655728	Cellulomonas	parahominis strain W7386	99,0	99,0	1335
AY655730	Cellulomonas	parahominis strain W7335	98,9	98,9	1335
AY655731	Cellulomonas	parahominis strain W7336	98,9	98,9	1335
AM403591	Cellulomonas	sp. R-32740 partial 16S rRNA gene, strain R-32740	98,9	98,9	1335
DQ815989	Uncultured ba	cterium clone aaa85c10	99,2	99,2	1321
AY655732	Cellulomonas	parahominis strain W7387	98,8	98,8	1336
AF479365	Glacial ice bac	terium SB12K-6-2 16S ribosomal RNA gene	98,8	98,8	1333
X82598	Cellulomonas	hominis 16S rRNA gene	98,7	98,7	1336

Accession	Description	<b>Query</b>	Max
		<b>coverage</b>	<u>ident</u>
<u>DQ816312.1</u>	Uncultured bacterium clone aaa79h04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
<u>AY655729.1</u>	Cellulomonas parahominis strain W7385 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>AY655728.1</u>	Cellulomonas parahominis strain W7386 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
DQ815989.1	Uncultured bacterium clone aaa85c10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	99%
<u>AY655730.1</u>	Cellulomonas parahominis strain W7335 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
AM403591.1	Cellulomonas sp. R-32740 partial 16S rRNA gene, strain R-32740	100%	98%
<u>AY655731.1</u>	Cellulomonas parahominis strain W7336 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>AY655732.1</u>	Cellulomonas parahominis strain W7387 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
AF479365.1	Glacial ice bacterium SB12K-6-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	98%
<u>X82598.1</u>	Cellulomonas hominis 16S rRNA gene	100%	98%

# Priloga A14: Sekvenca 34 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 34

agagtttgatcctggctcagATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGGGAGCAATCCTGGCGGCGAGTG ${\tt GCGAACGGGTGAGTAATGCATCGGAACGTACCCGGAAGTGGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATATTCTGTGAGCAGGA$ AAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTTTCGGAGCGGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCG  ${\tt TAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACCGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGG$ GCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGCGGGGAAGAAATGGCACTTTCTAATA  ${\tt CAGAGTGTTGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCGGA$  ${\tt ATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGTAAGTCAGATGTGAAATCCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAGACTGCACGG$ CTAGAGTGTGGCAGAGGGGGGGGGGGGGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTG GGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGGTG  ${\tt TTGGTGGGGTTAAACCCATTAGTGCCGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTG$ AGATTTGAGAGTGCCCGAAAGGGAGCCTGAACACAGGTGCTGCCATGGCTGTCGTCGTCGTGTGGGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCGAA  ${\tt CGAGCGCAACCCTTGTCGCTAATTGCCATCATTAAGTTGGGCACTTTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT$  ${\tt GAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCCGCGGGTGAAT$ ACGTTCCCgggtcttgtacacacgc

## Dolžina sekvence: 1390 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1353 nt

#### FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AV9/8000	Uncultured beta proteobacterium clone PRD18B04	96.3	96.3	1353
A 1 940000	Oneutrared beta proteobacterium cione i KD18D04	90,5	90,5	1555
D16209	Rhodocyclus tenuis gene for 16S ribosomal RNA	96,2	96,2	1353
BD356900	Probes and Primers for the Detection of Polyphosphate	96,2	96,2	1353
	Accumulating Organisms in Wastewater			1
DI080480	Probes and Primers for the Detection of	96,2	96,2	1353
	PolyphosphateAccumulating Organisms in Wastewater			1
DQ856536	Uncultured bacterium clone C2T 16S ribosomal RNA gene	96,4	96,4	1355
AY691423	Rhodocyclus sp. HOD 5 16S ribosomal RNA gene	96,2	96,2	1355
AY643079	Propionivibrio sp. Smarlab 3302698	96,2	96,2	1353
EF590005	Uncultured bacterium clone D24 16S ribosomal	96,1	96,1	1353
AJ307983	Propionivibrio limicola 16S rRNA gene, strain GolChi1 T	96,2	96,2	1355
AY530552	Perchlorate-reducing bacterium CR 16S ribosomal	96,1	96,1	1355

Accession	Description	<b>Query</b>	Max
		coverage	<u>ident</u>
<u>DQ856536.1</u>	Uncultured bacterium clone C2T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%
<u>AY948000.1</u>	Uncultured beta proteobacterium clone PRD18B04 16S ribosomal RNA gene, partial	100%	96%
	sequence		
<u>D16209.1</u>	Rhodocyclus tenuis gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: DSM110	100%	96%
<u>AY691423.1</u>	Rhodocyclus sp. HOD 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%
<u>AJ307983.1</u>	Propionivibrio limicola 16S rRNA gene, strain GolChi1 T	100%	96%
<u>AY643079.1</u>	Propionivibrio sp. Smarlab 3302698 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
<u>AY530552.1</u>	Perchlorate-reducing bacterium CR 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	100%	96%
<u>AY297805.1</u>	Beta proteobacterium pACH89 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
EF590005.2	Uncultured bacterium clone D24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	96%
<u>AB240462.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: SRRT09	100%	96%

# **Priloga A15**: Sekvenca 35 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 35

## Dolžina sekvence: 1334 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1297 nt

#### FASTA 3:

11101110.	~	** * * * * *	~	
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
DQ533878	Xanthobacter flavus strain WM2814	99,7	99,7	1298
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	98,9	98,9	1298
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	98,9	98,9	1298
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	98,9	98,9	1298
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	98,9	98,9	1291
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	98,9	98,9	1291
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15	98,7	98,7	1299
X94206	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	98,8	98,8	1291
				1

Accession	Description	<b>Query coverage</b>	Max ident
DQ533878.1	Xanthobacter flavus strain WM2814 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
AJ536689.1	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536687.1	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%	98%
AJ224614.1	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%	98%
<u>X94204.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99%	98%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99%	98%
AY561848.1	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>X94206.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	99%	98%

# Priloga A16: Sekvenca 36 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 36

## Dolžina sekvence: 1334 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1297 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
DQ533878	Xanthobacter flavus strain WM2814	99,8	99,8	1298
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	99,0	99,0	1298
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	99,0	99,0	1298
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	99,0	99,0	1298
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	99,0	99,0	1298
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	99,0	99,0	1298
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99,0	99,0	1291
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99,0	99,0	1291
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15	98,8	98,8	1299
X94205	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	98,8	98,8	1291

Blast:			
Accession	Description	Query	Max
		<u>coverage</u>	ident
DQ533878.1	Xanthobacter flavus strain WM2814 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
AJ536689.1	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	98%
<u>AJ536687.1</u>	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%	98%
AJ224614.1	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%	98%
<u>X94204.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99%	98%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99%	98%
AY561848.1	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
X94206.1	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	99%	98%

# Priloga A17: Sekvenca 38 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 38

## Dolžina sekvence: 1335 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1298 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	98,8	98,8	1298
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	98,8	98,8	1298
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	98,8	98,8	1298
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	98,8	98,8	1298
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	98,8	98,8	1298
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	98,8	98,8	1291
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	98,8	98,8	1291
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15	98,5	98,5	1299
X94202	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain H4-14)	98,7	98,7	1291
X94206	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	98,7	98,7	1291

Blast:			
Accession	Description	<b>Query</b>	Max
		<u>coverage</u>	<u>ident</u>
<u>EF592179.1</u>	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>AJ536689.1</u>	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	98%
<u>AJ536688.1</u>	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	98%
<u>AJ536687.1</u>	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%	98%
<u>AJ224614.1</u>	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%	98%
<u>X94204.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99%	98%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99%	98%
<u>AY561848.1</u>	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>X94206.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	99%	98%
<u>X94205.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	99%	98%

# Priloga A18: Sekvenca 42 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 42

## Dolžina sekvence: 1335 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1298 nt

FASTA 3:				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	97,7	97,7	1298
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	97,7	97,7	1298
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	97,7	97,7	1298
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	97,7	97,7	1298
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	97,7	97,7	1298
X94199	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	97,7	97,7	1291
X94204	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	97,7	97,7	1291
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15	97,5	97,5	1299
X94206	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	97,6	1291	
X94205	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	97,6	97,6	1291

Accession	Description	Query coverage	Max ident
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
AJ536689.1	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	97%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	97%
AJ536687.1	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%	97%
<u>AJ224614.1</u>	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%	97%
<u>X94204.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-1)	99%	97%
<u>X94199.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain 301)	99%	97%
<u>AY561848.1</u>	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
<u>X94206.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	99%	97%
<u>X94205.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	99%	97%

# **Priloga A19**: Sekvenca 48 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

#### >Sekvenca 48

agagtttgatcctggctcagATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCATGGGTGCTTGCACCTGATGGCGAG ${\tt TGGCGAACGGGTGAGTAATGCATCGGAACGTGCCCTGAAGTGGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATATTCTGTGAGCAG$ GAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTTGCGCTTTAGGAGCGGCCGATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATC CGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAAT GGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTCGGTGGGGAAGAAATGGTTTCGGTTAA  ${\tt TACCCGGAACTGATGACGGTACCCGCATAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTAATCG$  ${\tt GAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAGACTGCAC$ GGCTAGAGTGTGGCAGAGGGGGGGGAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCC  ${\tt TGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGA$  ${\tt TGTTGGAAGGGTTAAACCTTTTAGTGTCGTAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAAT$ AGAGATTTGGGAGTGCCCGAAAGGGAGCCTGAACACAGGTGCTGCCGCGTCGTCGTCGTCGTGTCGTGGGTTAGGGTTAAGTCCCCGC AACGAGCGCAACCCTTGTCGTTAATTGCCATCATTCAGTTGGGCACTTTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCCGGAGGAAGGTGGGGGATGAC  ${\tt CAGAAAGCCGATCGTAGTCCGGATTGCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCACTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCGCGGTGA$ ATACGTTCCCgggtcttgtacacacgc

## Dolžina sekvence: 1392 nt Dolžina sekvence brez mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r: 1355 nt

### FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AB200298	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, clone:	98,5	98,5	1355
	UTFS-OF08-d22-17			
EF589969	Uncultured bacterium clone D07	97,6	97,6	1355
AJ307983	Propionivibrio limicola 16S rRNA gene, strain GolChi1 T	97,6	97,6	1355
EF632939	Uncultured bacterium clone Pia-s-37	97,4	97,4	1355
EF 590005	Uncultured bacterium clone D24	97,5	97,5	1355
EF565154	Uncultured bacterium clone VIR_B4	97,5	97,5	1355
AY297809	Beta proteobacterium pACH94	97,5	97,5	1344
AY691423	Rhodocyclus sp. HOD 5	96,9	96,9	1355
DQ856536	Uncultured bacterium clone C2T	97,0	97,0	1355
Y17601	Propionivibrio dicarboxylicus 16S rRNA gene	96,8	96,8	1355

Accession	Description	Query	Max
	•	coverage	ident
AB200298.1	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: UTFS-	100%	98%
	OF08-d22-17		
AJ307983.1	Propionivibrio limicola 16S rRNA gene, strain GolChi1 T	100%	97%
EF589969.2	Uncultured bacterium clone D07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
EF590005.2	Uncultured bacterium clone D24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
EF565154.1	Uncultured bacterium clone VIR_B4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-	100%	97%
	23S intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial		
	sequence		
EF632939.1	Uncultured bacterium clone Pia-s-37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
<u>AY297809.1</u>	Beta proteobacterium pACH94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	97%
<u>AB240462.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: SRRT09	100%	97%
AY691423.1	Rhodocyclus sp. HOD 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	97%
AY643079.1	Propionivibrio sp. Smarlab 3302698 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	97%

**Priloge B**: Preverjanje sekvenc 2, 10 in 15 s programom Chimera Check (<u>http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU</u>) za možne himere. V programu smo uporabili sekvence, ki ne vsebujejo mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r (v sekvencah kot male tiskane črke).

# Priloga B1: Sekvenca 2 in možne himere. Rezultati so pridobljeni z uporabo programa Chimera Check.

### FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 500:

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16388	-	495	raw_16388 [Unknown form], 1300 bases, 1ED871A6 checksum.
AJ224614	0.954	1319	str. TV6-2b.
Xtb.flavu3	0.939	1348	Xanthobacter flavus str. JW/KR-1.
Xtb.flavu2	0.939	1347	Xanthobacter flavus str. H4-14.
Xtb.flavu4	0.939	1347	Xanthobacter flavus str. JW/KR-2.
Xtb.flavu5	0.939	1347	Xanthobacter flavus str. JW/KR-E1.
Xtb.flavus	0.939	1348	Xanthobacter flavus str. 301.
Xtb.autrp2	0.901	1342	Xanthobacter autotrophicus str. JW33.
<u>U62888</u>	0.901	1326	Xanthobacter autotrophicus str. T102.
<u>U62887</u>	0.901	1326	Xanthobacter autotrophicus str. T101.
Xtb.autrph	0.901	1343	Xanthobacter autotrophicus str. 7c (T).

### FRAGMENT 2, approximate sequence positions 501 to 1294:

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16388	-	764	raw_16388 [Unknown form], 1300 bases, 1ED871A6 checksum.
<u>Y17601</u>	0.882	1400	Propionivibrio dicarboxylicus DSM 5885.
AF016690	0.866	1405	Propionibacter pelophilus str. asp 66.
<u>AJ224937</u>	0.787	1251	Rhodocyclus sp. str. R6.
AF170349	0.783	1449	Dechlorisoma SDGM str. SDGM.
AJ009466	0.780	1451	clone SJA-52.
<u>AF170351</u>	0.776	1435	Dechlorisoma Iso2 str. Iso2.
AF170348	0.775	1453	Dechlorisoma suilla str. PS.
AF170350	0.775	1427	Dechlorisoma Iso1 str. Iso1.
AF011351	0.774	1364	Azoarcus BS2-3 str. BS2-3.
AF011347	0.774	1364	Azoarcus 6a3 str. 6a3.

#### FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 1294:

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16388	-	1224	raw_16388 [Unknown form], 1300 bases, 1ED871A6 checksum.
ASAJ3237	0.891	220	Azorhizobium sp. partial 16S rRNA gene, strain Br5401.
<u>AJ003237</u>	0.891	220	Azorhizobium Br5401 str. Br5401.
Azr.cauli5	0.833	252	Azorhizobium caulinodans str. MAR 1568 ORS 571 (T).
<u>AJ225382</u>	0.731	353	clone 28.
AF047640	0.726	409	clone TRB41.
<u>U45680</u>	0.721	362	clone AI356.
<u>Y17601</u>	0.717	1400	Propionivibrio dicarboxylicus DSM 5885.
PSERRNAA	0.717	152	Pseudomonas cepacia 16S rRNA, partial sequence.
env.PAD17	0.707	270	unidentified soil bacterium from paddy field clone PAD17.
AF016690	0.704	1405	Propionibacter pelophilus str. asp 66.

# **Priloga B2**: Sekvenca 10 in možne himere. Rezultati so pridobljeni z uporabo programa Chimera Check.

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16394	-	814	raw_16394 [Unknown form], 1342 bases, B5631579 checksum.
<u>AF078348</u>	0.738	409	unnamed organism.
AF107499	0.676	515	clone SY1-18.
AF009975	0.654	1394	clone LD29.
AF078286	0.648	423	unnamed organism.
env.WCHD88	0.635	1264	clone WCHD3-88.
env.AzC019	0.631	1430	clone C019.
AF013522	0.631	1430	Uncultivated soil bacterium clone C019 16S ribosomal RNA gene,
AF141391	0.617	462	clone CR-FL5.
AF107505	0.615	400	clone SY2-10.
AF128742	0.598	398	clone C0104.

### FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 850:

#### FRAGMENT 2, approximate sequence positions 851 to 1336:

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16394	-	485	raw_16394 [Unknown form], 1342 bases, B5631579 checksum.
Xtb.flavu3	0.940	1348	Xanthobacter flavus str. JW/KR-1.
Xtb.flavu2	0.940	1347	Xanthobacter flavus str. H4-14.
Xtb.flavu5	0.940	1347	Xanthobacter flavus str. JW/KR-E1.
Xtb.flavu4	0.940	1347	Xanthobacter flavus str. JW/KR-2.
Xtb.flavus	0.940	1348	Xanthobacter flavus str. 301.
AJ224614	0.938	1319	str. TV6-2b.
AJ224616	0.893	1304	str. Z4A-2.
<u>AJ224615</u>	0.893	1300	str. Z2A-6A.
Xtb.tageti	0.893	1340	Xanthobacter tagetidis str. TagT2C.
Azr.cauli7	0.889	1344	Azorhizobium caulinodans str. MAR 1568 ORS 571 (T).

#### FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 1336:

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16394	-	1272	raw_16394 [Unknown form], 1342 bases, B5631579 checksum.
<u>U81650</u>	0.753	485	clone vadinBA44.
<u>UEU81650</u>	0.753	485	Unidentified eubacterium clone vadinBA44 16S ribosomal RNA gene,
AF078348	0.741	409	unnamed organism.
AB003984	0.736	148	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003981</u>	0.723	148	Acetobacter liquefaciens 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003980</u>	0.723	148	Acetobacter liquefaciens 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003979</u>	0.723	148	Acetobacter liquefaciens 16S rRNA, partial sequence.
AB003987	0.714	147	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003986</u>	0.714	147	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
AB003988	0.714	147	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.

# **Priloga B3**: Sekvenca 15 in možne himere. Rezultati so pridobljeni z uporabo programa Chimera Check.

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16399	-	1175	raw_16399 [Unknown form], 1464 bases, 276AD850 checksum.
<u>AJ010961</u>	0.691	1433	Anaerovibrio burkinabensis DSM 6283.
AJ010962	0.674	1404	DSM 1736.
<u>AJ009494</u>	0.672	1449	clone SJA-143.
<u>AF071415</u>	0.671	1457	Anaeromusa acidaminophila DSM 3853.
AJ010960	0.668	1421	Anaerovibrio glycerini DSM 5192.
AJ010964	0.636	1425	Acetonema longum str. APO-1 DSM 6540 (T).
C.quercico	0.635	1412	Clostridium quercicolum ATCC 25974 (T).
<u>Y17761</u>	0.628	1409	Sporomusa DR5 str. DR5.
AJ009477	0.624	1450	clone SJA-84.
AJ006606	0.623	547	str. STP11.

### FRAGMENT 1, approximate sequence positions 1 to 1260:

#### FRAGMENT 2, approximate sequence positions 1261 to 1458:

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16399	-	198	raw_16399 [Unknown form], 1464 bases, 276AD850 checksum.
<u>U62888</u>	1.000	1326	Xanthobacter autotrophicus str. T102.
<u>U62887</u>	1.000	1326	Xanthobacter autotrophicus str. T101.
Xtb.autrp2	1.000	1342	Xanthobacter autotrophicus str. JW33.
Xtb.autrph	1.000	1343	Xanthobacter autotrophicus str. 7c (T).
Xtb.flavu3	0.899	1348	Xanthobacter flavus str. JW/KR-1.
Xtb.flavus	0.899	1348	Xanthobacter flavus str. 301.
Xtb.flavu2	0.899	1347	Xanthobacter flavus str. H4-14.
Xtb.flavu5	0.899	1347	Xanthobacter flavus str. JW/KR-E1.
Xtb.flavu4	0.899	1347	Xanthobacter flavus str. JW/KR-2.
Xtb.agilis	0.899	1346	Xanthobacter agilis str. SA35.

#### FULL LENGTH SEQUENCE, from position 1 to 1458:

Short-ID	S_ab	Olis	Full name
raw_16399	-	1355	raw_16399 [Unknown form], 1464 bases, 276AD850 checksum.
AB003982	0.748	147	Acetobacter hansenii 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003984</u>	0.723	148	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003987</u>	0.721	147	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003986</u>	0.721	147	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003985</u>	0.721	147	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003988</u>	0.721	147	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003974</u>	0.712	146	Acetobacter pasteurianus 16S rRNA, partial sequence.
<u>AB003983</u>	0.705	149	Acetobacter xylinum 16S rRNA, partial sequence.
AB003981	0.703	148	Acetobacter liquefaciens 16S rRNA, partial sequence.
AB003980	0.696	148	Acetobacter liquefaciens 16S rRNA, partial sequence.

**Priloge C**: Rezultati iskanja najpodobnejših sekvenc delom sekvenc 2, 10 in 15 v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast z dne 10.11.2008. V algoritmih smo uporabili sekvence, ki ne vsebujejo mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r (v sekvencah kot male tiskane črke).

# Priloga C1: Sekvenca 2 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

i luginent 1. poziciju i do 500 n	Fragment 1	: pozicija	1 do	500	nt
-----------------------------------	------------	------------	------	-----	----

rasta 3.	Fasta	3	:
----------	-------	---	---

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	99,4	99,4	500
AJ536687	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	99,4	99,4	500
AJ536688	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	99,4	99,4	500
AJ536689	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	99,4	99,4	500
AJ224614	alpha proteobacterium TV6-2b	99,4	99,4	500
CP000781	Xanthobacter autotrophicus Py2	99,2	99,2	500
AY561848	Xanthobacter flavus clone UE-15	99,2	99,2	501
DQ533878	Xanthobacter flavus clone WM2814	99,2	99,2	500
X94202	X. flavus (strain H4-14)	99,4	99,4	493
X94205	X. flavus (strain JW/KR-2)	99,4	99,4	493

Accession	Description	<b>Query coverage</b>	Max ident
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
AJ536689.1	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	99%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	99%
<u>AJ536687.1</u>	Bacterium RBS3-84 16S rRNA gene	100%	99%
<u>AJ224614.1</u>	alpha proteobacterium TV6-2b, 16S rRNA gene	100%	99%
<u>CP000781.1</u>	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	100%	99%
<u>AY561848.1</u>	Xanthobacter flavus clone UE-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
<u>DQ533878.1</u>	Xanthobacter flavus strain WM2814 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
<u>X94206.1</u>	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-E1)	98%	99%
X94205.1	X.flavus 16S ribosomal RNA (strain JW/KR-2)	98%	99%

## Fragment 2: pozicija 501 do 1294 nt (oznaka 2b\*)

## FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
Y17601	Propionivibrio dicarboxylicus 16S rRNA gene	97,7	97,7	793
AB062831	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone:BCf6-08	96,9	96,9	800
EF589969	Uncultured bacterium clone D07 16S ribosomal RNA gene	96,8	96,8	800
AF450471	Uncultured beta proteobacterium clone Orbal D45	96,8	96,8	800
AF016690	Propionibacter pelophilus 16S ribosomal RNA gene	96,6	96,6	800
BD356906	Probes and Primers for the Detection of Polyphosphate	96,6	96,6	800
	Accumulating Organisms in Wastewater			
DI081119	Probes and Primers for the Detection of Polyphosphate	96,6	96,6	800
	Accumulating			
AB089103	Uncultured beta proteobacterium gene for 16S rRNA	96,2	96,2	800
AB200298	Uncultured bacterium gene, clone: UTFS-OF08-d22-17	96,5	96,5	793
DQ856536	Uncultured bacterium clone C2T 16S ribosomal RNA gene	96,4	96,4	800

Accession	Description		Max
		coverage	ident
<u>Y17601.1</u>	Propionivibrio dicarboxylicus 16S rRNA gene, partial	99%	97%
<u>AB062831.1</u>	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:BCf6-08	99%	97%
EF589969.2	Uncultured bacterium clone D07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AF450471.1	Uncultured beta proteobacterium clone Orbal D45 16S ribosomal RNA gene	99%	96%
AF016690.1	Propionibacter pelophilus 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	96%
FJ167460.1	Uncultured bacterium clone R1B-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
<u>AB089103.1</u>	Uncultured beta proteobacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone:Rs-K54	99%	96%
<u>CU466848.1</u>	Environmental 16s rDNA sequence from Evry wastewater treatment plant anoxic basin	99%	96%
DQ856536.1	Uncultured bacterium clone C2T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	96%
AB200298.1	Uncultured bacterium gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: UTFS-	99%	96%
	OF08-d22-17		

# **Priloga C2**: Sekvenca 10 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

Fragment 1: pozicija 1 do 850 nt (oznaka 10a\*)

## FASTA 3:

Source	Identity %	Similarity %	Overlap
Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: CK06-	98,9	98,9	850
06_Mud_MAS1B-05			
Spartobacteria bacterium Gsoil 144	93,8	93,8	850
Spartobacteria bacterium Gsoil 133	93,8	93,8	850
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	93,4	93,4	850
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU38	93,4	93,4	850
Uncultured bacterium clone SL6/173	93,4	93,4	850
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU	93,3	93,3	850
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 26BSF33 8	93,3	93,3	850
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	92,9	92,9	850
Agricultural soil bacterium clone SC-I-7	92,9	92,9	850
	Source Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: CK06- 06_Mud_MAS1B-05 Spartobacteria bacterium Gsoil 144 Spartobacteria bacterium Gsoil 133 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU38 Uncultured bacterium clone SL6/173 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 26BSF33 8 Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33 Agricultural soil bacterium clone SC-I-7	SourceIdentity %Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: CK06- 06_Mud_MAS1B-0598,9Spartobacteria bacterium Gsoil 14493,8Spartobacteria bacterium Gsoil 13393,8Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF5093,4Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU3893,4Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU93,4Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU93,3Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU93,3Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 26BSF3393,3Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF3392,9Agricultural soil bacterium clone SC-I-792,9	SourceIdentity %Similarity %Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, clone: CK06- 06_Mud_MAS1B-0598,998,906_Mud_MAS1B-0593,893,8Spartobacteria bacterium Gsoil 14493,893,8Spartobacteria bacterium Gsoil 13393,893,8Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF5093,493,4Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU3893,493,4Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU93,393,3Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU93,393,3Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 26BSF33 893,393,3Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF3392,992,9Agricultural soil bacterium clone SC-I-792,992,9

Blast:			
Accession	Description	Query	Max
		<u>coverage</u>	<u>ident</u>
AB369162.1	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: CK06-	100%	98%
	06_Mud_MAS1B-05		
<u>AB245342.1</u>	Spartobacteria bacterium Gsoil 144 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	93%
<u>AB245341.1</u>	Spartobacteria bacterium Gsoil 133 gene for 16S rRNA, partial sequence	100%	93%
EU715877.1	Uncultured bacterium clone SL6/173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	93%
<u>AJ863245.1</u>	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF50	100%	93%
<u>AJ863204.1</u>	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU38	100%	93%
<u>AJ863249.1</u>	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 26BSF33	100%	93%
<u>AJ863206.1</u>	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 25BSU8	100%	93%
AJ863248.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 26BSF34	100%	92%
AJ863244.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 21BSF33	100%	92%

## Fragment 2: pozicija 851 do 1336 nt

## FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
DQ533878	Xanthobacter flavus strain WM2814	99,6	99,6	492
EF219040	Xanthobacter sp. ROi16	98,6	98,6	492
X99469	X.tagetidis 16S RNA gene	98,4	98,4	492
AJ224616	alpha proteobacterium Z4A-2	98,4	98,4	492
AJ224615	alpha proteobacterium	98,4	98,4	492
CP000781	Xanthobacter autotrophicus Py2	98,2	98,2	492
EF592179	Xanthobacter flavus strain ENV481	98,2	98,2	492
X94202	X. flavus (strain H4-14)	98,2	98,2	492
X94206	X. flavus (strain JW/KR-E1)	98,2	98,2	492
X94204	X. flavus (strain JW/KR-1)	98,2	98,2	492

Accession	Description	Query coverage	Max ident
DQ533878.1	Xanthobacter flavus strain WM2814 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	99%
EF219040.1	Xanthobacter sp. ROi16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>X99469.1</u>	X.tagetidis 16S RNA gene	100%	98%
<u>AJ224616.1</u>	alpha proteobacterium Z4A-2, 16S rRNA gene	100%	98%
<u>AJ224615.1</u>	alpha proteobacterium Z2A-6A, 16S rRNA gene	100%	98%
<u>CP000781.1</u>	Xanthobacter autotrophicus Py2, complete genome	100%	98%
EF592179.1	Xanthobacter flavus strain ENV481 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>AY436816.1</u>	Xanthobacter sp. EP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98%
<u>AJ536689.1</u>	Bacterium RBS4-92 16S rRNA gene	100%	98%
AJ536688.1	Bacterium RBS4-86 16S rRNA gene	100%	98%

# **Priloga C3**: Sekvenca 15 in najpodobnejše sekvence v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast.

## Fragment 1: pozicija 1 do 1260 nt

### FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
EU567043	Uncultured Pseudomonas sp. clone TCCC 11092	88,0	88,0	1275
AF407698	Uncultured bacterium clone G07	93,2	93,2	1101
AJ010961	Anaerovibrio burkinabensis DSM 6283(T)	92,8	92,8	1100
AF071415	Anaeromusa acidaminophila 16S ribosomal RNA	92,6	92,6	1099
AJ229233	Unidentified eubacterium from anoxic bulk soil	91,0	91,0	1142
AF349762	Uncultured bacterium TCE33	92,3	92,3	1099
AJ488092	Uncultured bacterium 16S rRNA gene, clone IIIA-2	92,2	92,2	1099
AJ488089	Uncultured bacterium 16S rRNA gene, clone IIB-7	92,2	92,2	1099
AY685141	Selenomonas ruminantium isolate L14	87,2	87,2	1270
EU307103	Uncultured bacterium clone C-u_Lac-1_66	86,9	86,9	1275
1				

Accession	Description	<b>Query coverage</b>	Max ident
<u>AF407698.1</u>	Uncultured bacterium clone G07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	97%
AJ010961.1	Anaerovibrio burkinabensis DSM 6283(T), 16S rRNA gene	90%	92%
AF071415.1	Anaeromusa acidaminophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	92%
AF349762.2	Uncultured bacterium TCE33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	97%
AJ488092.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIIA-2	90%	97%
AJ488089.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIB-7	90%	97%
AJ009494.1	uncultured bacterium SJA-143 16S rRNA gene, clone SJA-143	90%	100%
<u>AJ229233.1</u>	Unidentified eubacterium from anoxic bulk soil 16S rRNA gene (clone BSV90)	89%	91%
DQ069215.1	Uncultured Clostridia bacterium clone FW29 16S ribosomal RNA gene	90%	100%
AJ488080.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IB-27	90%	97%

## Fragment 2: pozicija 1261 do 1485 nt

## FASTA 3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
X94203	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain JW33)	100,0	100,0	204
X94201	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain 7c)	100,0	100,0	204
AJ878420	Xanthobacter autotrophicus 16S rRNA gene, strain 2	100,0	100,0	204
U62888	Xanthobacter autotrophicus T102	100,0	100,0	204
U62887	Xanthobacter autotrophicus T101	100,0	100,0	204
AJ878421	Xanthobacter autotrophicus 16S rRNA gene, strain 4	100,0	100,0	204
AB074716	Alpha proteobacterium S-C(1)-18B2	100,0	100,0	204
AB074717	Alpha proteobacterium S-C(2)-18A	100,0	100,0	204
AJ878419	Xanthobacter autotrophicus 16S rRNA gene, strain 5	100,0	100,0	204
EF540453	Ancylobacter sp. b1M	99,5	99,5	204

Accession	Description	Query	Max
		<u>coverage</u>	ident
EU982303.1	Xanthobacter autotrophicus strain HYS0201-SM02 16S ribosomal RNA gene	100%	100%
<u>AB074717.1</u>	Alpha proteobacterium S-C(2)-18A gene for 16S ribosomal RNA, partial seq	100%	100%
AB074716.1	Alpha proteobacterium S-C(1)-18B2 gene for 16S ribosomal RNA, partial seq	100%	100%
<u>U62888.1</u>	Xanthobacter autotrophicus T102 16S ribosomal RNA gene, complete seq	100%	100%
<u>U62887.1</u>	Xanthobacter autotrophicus T101 16S ribosomal RNA gene, complete seq	100%	100%
<u>AJ878421.1</u>	Xanthobacter autotrophicus partial 16S rRNA gene, strain 4	100%	100%
AJ878420.1	Xanthobacter autotrophicus partial 16S rRNA gene, strain 2	100%	100%
<u>AJ878419.1</u>	Xanthobacter autotrophicus partial 16S rRNA gene, strain 5	100%	100%
<u>X94203.1</u>	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain JW33)	100%	100%
<u>X94201.1</u>	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain 7c)	100%	100%

**Priloge D**: Ročno popravljanje dolžin himernih sekvenc sekvence 15. Rezultati iskanja najpodobnejših sekvenc delom sekvence 15 v bazah podatkov z algoritmoma FASTA 3 in Blast z dne 10.11.2008. V algoritmih smo uporabili sekvence, ki ne vsebujejo mest naleganja začetnih oligonukleotidov fD1 in 1401r (v sekvencah kot male tiskane črke).

Priloga D1: Prvi del sekvence 15; in sicer od mesta 1 do mesta 265 nukleotida.

FASTA3	•
110110	•

11101110.				
ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
EU567043	Uncultured Pseudomonas sp. clone TCCC 11092	79,4	79,4	252
AY524568	Uncultured bacterium clone Gly030-5C	77,6	77,6	250
EF544631	Uncultured bacterium clone KFeR2-10	76,1	76,1	251
DQ424926	Uncultured bacterium clone C74	74,5	74,5	255
EU307103	Uncultured bacterium clone C-u_Lac-1_66	76,6	76,6	252

### Blast:

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
EU567043.1	Uncultured Pseudomonas sp. clone TCCC 11092 16S ribosomal RNA	92%	2e-44	81%
<u>AY524568.1</u>	Uncultured bacterium clone Gly030-5C 16S ribosomal RNA gene	92%	9e-43	81%
EU307103.1	Uncultured bacterium clone C-u_Lac-1_66 16S ribosomal RNA gene	92%	1e-36	79%
EU215386.1	Pelosinus sp. UFO1 16S ribosomal RNA pseudogene, complete seq	92%	2e-34	79%
EF544631.1	Uncultured bacterium clone KFeR2-10 16S ribosomal RNA gene	92%	2e-34	79%

**Priloga D2**: Drugi del sekvence 15; in sicer od mesta 266 do mesta 1262 nukleotida. (oznaka 15b\*)

### FASTA3:

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
AF407698	Uncultured bacterium clone G07	94,7	94,7	990
AJ010961	Anaerovibrio burkinabensis DSM 6283(T)	94,2	94,2	991
AF071415	Anaeromusa acidaminophila 16S ribosomal RNA gene	94,0	94,0	990
AF349762	Uncultured bacterium TCE33	93,6	93,6	999
AJ010962	Clostridium quercicolum 16S rRNA gene, strain DSM 1736(T)	93,8	93,8	990

Accession	Description	Query coverage	Max ident
AF407698.1	Uncultured bacterium clone G07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	95%
AJ010961.1	Anaerovibrio burkinabensis DSM 6283(T), 16S rRNA gene	99%	94%
AF071415.1	Anaeromusa acidaminophila 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	94%
AF349762.2	Uncultured bacterium TCE33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	94%
<u>AJ488092.1</u>	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIIA-2	99%	94%
EU307090.1	Uncultured bacterium clone A_Lac-1_5 16S ribosomal RNA gene	99%	94%
DQ069215.1	Uncultured Clostridia bacterium clone FW29 16S ribosomal RNA gene	99%	93%
AJ010962.1	Clostridium quercicolum 16S rRNA gene, strain DSM 1736(T)	99%	94%
AJ488089.1	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone IIB-7	99%	93%
AJ229233.1	Unidentified eubacterium from anoxic bulk soil 16S rRNA gene (clone BSV90)	99%	93%

Priloga D3: Tretji del sekvence 15; in sicer od mesta 1263 do mesta 1464 nukleoti	ida.
-----------------------------------------------------------------------------------	------

	-
	2.
TASIA	э.

ID	Source	Identity %	Similarity %	Overlap
X94201	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain 7c)	100,0	100,0	202
AJ878420	Xanthobacter autotrophicus partial 16S rRNA gene, strain 2	100,0	100,0	202
U62887	Xanthobacter autotrophicus T101Xanthobacter autotrophicus	100,0	100,0	202
AJ878421	partial 16S rRNA gene, strain 4	100,0	100,0	202
EF540453	Ancylobacter sp. b1M 16S ribosomal RNA gene	99,5	99,5	202

Accession	Description	<b>Query coverage</b>	E value	Max ident
EU982303.1	Xanthobacter autotrophicus strain HYS0201-SM02 16S ribosomal RNA	100%	1e-100	100%
<u>AB074717.1</u>	Alpha proteobacterium S-C(2)-18A gene for 16S ribosomal RNA,	100%	1e-100	100%
AB074716.1	Alpha proteobacterium S-C(1)-18B2 gene for 16S ribosomal RNA	100%	1e-100	100%
<u>U62888.1</u>	Xanthobacter autotrophicus T102 16S ribosomal RNA gene, complete	100%	1e-100	100%
<u>U62887.1</u>	Xanthobacter autotrophicus T101 16S ribosomal RNA gene, complete	100%	1e-100	100%
<u>AJ878421.1</u>	Xanthobacter autotrophicus partial 16S rRNA gene, strain 4	100%	1e-100	100%
AJ878420.1	Xanthobacter autotrophicus partial 16S rRNA gene, strain 2	100%	1e-100	100%
AJ878419.1	Xanthobacter autotrophicus partial 16S rRNA gene, strain 5	100%	1e-100	100%
<u>X94203.1</u>	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain JW33)	100%	1e-100	100%
<u>X94201.1</u>	X.autotrophicus 16S ribosomal RNA (strain 7c)	100%	1e-100	100%