

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona GRAMC

**OPIS MIKROBNE ZDRUŽBE IZ VSEBINE  
PREBAVNEGA TRAKTA IN IZTREBKOV  
MOČERILA (*Proteus anguinus*) Z MOLEKULARNIMI  
METODAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona GRAMC

**OPIS MIKROBNE ZDРUŽBE IZ VSEBINE PREBAVNEGA TRAKTA  
IN IZTREBKOV MOČERILA (*Proteus anguinus*) Z  
MOLEKULARNIMI METODAMI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**CHARACTERISATION OF MICROBIAL COMMUNITY IN  
INTESTINE AND FECES OF SALAMANDER (*Proteus anguinus*)  
WITH MOLECULAR APPROACH**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo in mikrobro tehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avguština, za somentorico dr. Lijano Fanedl, za recenzentko pa prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Somentorica: dr. Lijana Fanedl

Recenzentka: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: dr. Lijana FANEDL  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona Gramc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

**ŠD** Dn  
**DK** UDK 579.26:597.98:577.2.083(043)=163.6  
**KG** mikrobne združbe/prebavni trakt/iztrebki/močeril/*Proteus anguinus/Proteus anguinus* parkelj/molekularne tehnike/klonske knjižnice/fluorescentna *in situ* hibridizacija  
**AV** GRAMC, Simona  
**SA** AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/ FANEDL, Lijana (somentorica)/ MANDIĆ-MULEC, Ines (recenzentka)  
**KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
**LI** 2012  
**IN** OPIS MIKROBNE ZDRUŽBE IZ VSEBINE PREBAVNEGA TRAKTA IN IZTREBKOV MOČERILA (*Proteus anguinus*) Z MOLEKULARNIMI METODAMI  
**TD** Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
**OP** XI, 64 str., 26 sl., 6 pregl., 1 pril., 113 vir.  
**IJ** sl  
**JI** sl/en  
**AI** Močeril (*Proteus anguinus*) je največji poznani jamski vretenčar, za katerega je značilno življenje v specifičnem jamskem okolju, dolga življenjska doba in zmožnost preživetja dolgotrajnega stradanja. V okviru diplomske naloge smo žeeli podrobnejše spoznati mikrobno združbo prebavnega trakta močerila. Ker smo lahko uporabili le en vzorec vsebine prebavnega trakta močerila, smo pri analizi uporabili še feces močerila iz ujetništva. Izolirali smo skupno mikrobno DNK iz vsebine prebavnega trakta močerila ulovljene v Planinski jami in iz fecesa črnega močerila iz ujetništva ter pripravili klonsko knjižnico bakterijskih genov za 16S rRNA. Pridobljene sekvence smo primerjali z dostopnimi sekvencami v bazi podatkov RDP II in Greengenes. Največji delež sekvenc je pripadal bakterijskemu deblu *Firmicutes* (skoraj 90 %), medtem ko je manjši delež pripadal deblom *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* in *Proteobacteria*. Da bi pokazali prisotnost dominantne mikrobne populacije v vzorcih močerila, smo vzorce analizirali s tehniko fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH). Potrebovali smo ustrezno sondu, ki bi se specifično vezala na komplementarne nukleotidne sekvene tarčnih bakterijskih celic iz debla *Firmicutes* in družine *Peptostreptococcaceae*. Ker taka sonda še ni bila poznana, smo jo pripravili sami. Rezultati tehnikе FISH so pokazali, da je dominantna skupina bakterij sicer prisotna v vzorcih vsebine prebavnega trakta in fecesa močerila, ni pa bilo mogoče določiti kakšen je bil njen delež. Zato smo predmetna stekelca, na katerih smo izvedli FISH, pobarvali še s fluorescentnim barvilo fluorescein izotiocianat (FITC), ki ima drugačno valovno dolžino oddane svetlobe od barvila Cy3, s katerim so bile označene sonde. Ko smo uporabili obe tehniki hkrati, smo lahko primerjali isti preparat in ista vidna polja z različnimi optičnimi filteri, ki so enkrat prepuščali barvilo FITC (večina prisotnih bakterij), drugič pa svetlobo Cy3 (bakterije iz v družine *Peptostreptococcaceae*). Barvilo FITC se je vezalo tudi na abiotiski material prisoten v hibridiziranem vzorcu, kar je onemogočilo kvantitativno analizo slike. Filogenetska analiza pridobljenih sekvenč je pokazala, da je mikrobiološka pestrost prebavnega trakta močerila v resnici majhna ter da precejšen del mikroorganizmov, ki naseljujejo prebavni trakt močerila, sodi v doslej še neopisane vrste. Tehnika FISH pa je pokazala, da je dominantna skupina bakterij prisotna v vseh vzorcih. V diplomski nalogi smo uporabili le en vzorec vsebine prebavnega trakta in nekaj vzorcev fecesa močerila. Da bi lahko potrdili ali ovrgli rezultate, bi bilo potrebno analizirati večje število vzorcev.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn  
DC UDC 579.26:597.98:577.2.083(043)=163.6  
CX microbial communities/intestine/feces/salamander/*Proteus anguinus*/*Proteus anguinus* parkelj/molecular techniques/clone libraries/fluorescent *in situ* hybridization  
AU GRAMC, Simona  
AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/ FANEDL, Lijana (co-advisor)/ MANDIĆ-MULEC, Ines (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2012  
TI CHARACTERISATION OF MICROBIAL COMMUNITY IN INTESTINE AND FECES OF SALAMANDER (*Proteus anguinus*) WITH MOLECULAR APPROACH  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 64 p., 26 fig., 6 tab., 1 ann., 113 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Salamander (*Proteus anguinus*) is the largest known cave species, which lives in a specific cave environment, is able to survive prolonged starvation and can live for a long time. In this graduation thesis we aimed to identify microbial community of the digestive tract of salamander. Since we could only use the samples of one salamander's digestive tract we compared this to the fecal samples of salamanders that were in captivity. We isolated the total microbial DNA from the digestive tract of the salamander caught in the Planinska jama and from fecal samples from salamanders in captivity and prepared the clone library of 16S rRNA bacterial genes. Obtained sequences were compared with the available sequences from database RDP II and Greengenes. Most of the obtained sequences belonged to the Phylum *Firmicutes* (almost 90 %), while a smaller proportion belonged to the Phylum *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. To demonstrate the presence of dominant microbial populations in samples, we analyzed them with fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with the newly designed probe specific for the Phylum *Firmicutes*, Family *Peptostreptococcaceae*. The FISH showed that the dominant group of bacteria was present in all samples of the digestive tract and feaces. Unfortunately we could not quantitate the dominant group by FISH in relation to other bacteria in the sample. Therefore we coloured the slides, on which we performed FISH, with fluorescent dye fluorescein isothiocyanate (FITC), which has a different wavelength of light emitted compared to the Cy3 labeled FISH probe. Due to unspecific binding of FITC, quantification of the total number of bacteria in the sample was still not successful. Phylogenetic analysis of cloned sequences showed that the microbial diversity of the digestive tract of salamander is low and that a considerable part of the microorganisms that inhabit the digestive tract of the cave salamander belongs to as yet unidentified species. The FISH showed that the dominant group of bacteria is present in all examined samples. In this graduation thesis we used only one sample of digestive tract of *Proteus anguinus* and additional faecal samples of salamander from captivity. In order to confirm or invalidate the results, it would be necessary to analyze more samples.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE .....	V
KAZALO PRILOG .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	1
1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	2
2.1 KRATEK ZGODOVINSKI PREGLED OPISOV IN RAZISKAV ČLOVEŠKE RIBICE ALI MOČERILA .....	2
2.2 MOČERIL ( <i>Proteus anguinus</i> ) .....	2
<b>2.2.1 Podvrste močerila .....</b>	3
2.3 STRUKTURA PREBAVNEGA TRAKTA MOČERILA .....	3
2.4 POMEN BAKTERIJ V PREBAVNEM TRAKTU .....	5
2.5 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE PREBAVNEGA TRAKTA ŽIVALI .....	6
2.5.1 <b>Tradicionalne mikrobiološke metode za preučevanje mikrobnih združb .....</b>	6
2.5.2 <b>Molekularne metode za preučevanje mikrobnih združb .....</b>	6
2.5.2.1 Pridobivanje sekvenc iz okoljskih vzorcev .....	7
2.5.2.2 Sekvenciranje in analiza sekvenc .....	8
2.5.2.3 Fluorescentna in situ hibridizacija .....	9
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	12
3.1 MATERIALI .....	12
<b>3.1.1 Kras in jame .....</b>	12
3.1.1.1 Planinska jama .....	12
<b>3.1.2 Vzorci .....</b>	13
<b>3.1.3 Kompleti .....</b>	13
<b>3.1.4 Raztopine in pufri .....</b>	14
<b>3.1.5 Gojišča .....</b>	14
3.2 METODE .....	15
<b>3.2.1 Sekcija močerila (<i>Proteus anguinus anguinus</i>) in odvzem vsebine prebavnega trakta .....</b>	15
<b>3.2.2 Izolacija skupne mikrobine DNK .....</b>	15
<b>3.2.3 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) .....</b>	16
<b>3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza .....</b>	19
<b>3.2.5 Priprava kompetentnih celice .....</b>	19
<b>3.2.6 Priprava klonske knjižnice .....</b>	19
<b>3.2.7 Sekvenciranje in analiza sekvenc .....</b>	20
<b>3.2.8 Priprava začetnih oligonukleotidov .....</b>	20
<b>3.2.9 FISH (Fluorescent <i>in situ</i> hybridization) .....</b>	21
3.2.9.1 Oligonukleotidne sonde .....	21
3.2.9.2 Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija .....	21

<b>3.2.10 Epifluorescentna mikroskopija in mikrofotografija .....</b>	22
<b>4 REZULTATI.....</b>	23
4.1 MIKROSKOPSKA ANALIZA VSEBINE PREBAVNEGA TRAKTA MOČERILA .....	23
4.2 IZOLACIJA SKUPNE MIKROBNE DNK IN POMNOŽEVANJE BAKTERIJSKIH IN ARHEJSKIH GENOV ZA 16S rRNK Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR) .....	24
4.3 PRIPRAVA KLONSKIH KNJIŽNIC GENOV ZA 16S rRNK POMNOŽENIH Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO .....	25
4.4 FILOGENETSKA ANALIZA SEKVENC .....	30
4.4.1 Analiza filogenetske skupine PA 5 – firmikuti I .....	33
4.4.2 Analiza filogenetske skupine PA 4 – firmikuti II .....	36
4.4.3 Analiza filogenetske skupine PA 3 - fusobakterije .....	37
4.4.4 Analiza filogenetske skupine PA 2 - $\gamma$ -proteobakterije .....	38
4.4.5 Analiza filogenetske skupine PA 1 - bakteroidete .....	38
4.5 PRIPRAVA IN ANALIZA SPECIFIČNOSTI ZAČETNEGA OLIGONUKLEOTIDA SimN .....	39
4.5.1 Primerjava verižne reakcije s polimerazo z različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov kot prikaz uporabnosti oligonukleotidne sonde SimN ..	41
4.6 FLUORESCENTNA IN SITU HIBRIDIZACIJA.....	42
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	47
5.1 RAZPRAVA.....	47
SKLEPI.....	52
<b>6 POVZETEK.....</b>	53
<b>7 VIRI .....</b>	55
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Prerez telesa močerila z vidnim prebavnim traktom (Configliachi in Rusconi, 1818: 119).....	4
<b>Slika 2:</b> Planinska jama (Zupan Hajna in sod., 2008: 74).....	12
<b>Slika 3:</b> Fluorescentna mikroskopija vzorca vsebine prebavnega traka močerila .....	23
<b>Slika 4:</b> Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR).....	25
<b>Slika 5:</b> Rezultati taksonomske umestitve sekvenc genov za 16S rRNK v filogenetski bakterijski sistem z orodjem RDP Clasifier (Cole in sod., 2005) .....	26
<b>Slika 6:</b> Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse.....	26
<b>Slika 7:</b> Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse.....	27
<b>Slika 8:</b> Rezultati taksonomske umestitve sekvenc genov za 16S rRNK v filogenetski bakterijski sistem z orodjem RDP Clasifier (Cole in sod., 2005) .....	28
<b>Slika 9:</b> Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse.....	29
<b>Slika 10:</b> Rezultati taksonomske umestitve sekvenc genov za 16S rRNK v filogenetski bakterijski sistem z orodjem RDP Clasifier (Cole in sod., 2005) .....	30
<b>Slika 11:</b> Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc genov za 16S rRNK iz vzorca vsebine prebavnega traka močerila PT in fekalnega vzorca črnega močerila Č16 .....	32
<b>Slika 12:</b> Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 5 in znotraj nje razvrstitev podskupin z oznako PA 5.1 – PA 5.12 .....	34
<b>Slika 13:</b> Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 4 .....	37
<b>Slika 14:</b> Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 3 .....	37
<b>Slika 15:</b> Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 2 .....	38
<b>Slika 16:</b> Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 1 .....	39

<b>Slika 17:</b> 1 % agarozni gel s PCR pomnoženimi deli genov za 16S rRNK s parom začetnih oligonukleotidov Fd1-1401r (kontrola) ter SimN-1401r.....	41
<b>Slika 18:</b> Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca <i>P. anguinus parkelj</i> Č16 <sub>26/8/09</sub> obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi .....	42
<b>Slika 19:</b> Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca <i>P. anguinus</i> P194 <sub>11/06/09</sub> obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi .....	43
<b>Slika 20:</b> Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca <i>P. anguinus</i> P194 <sub>27/7/09</sub> obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi .....	43
<b>Slika 21:</b> Slika epifluorescentne mikroskopije vzorcev vsebine zadnjega dela prebavnega trakta <i>P. anguinus</i> PT <sub>28/10/08</sub> obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi.....	44
<b>Slika 22:</b> Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca <i>P. anguinus parkelj</i> Č16 <sub>26/8/09</sub> obdelanega s FISH s sondom SimN-Cy3 in barvanega s FITC v istem vidnem polju, pod različnim filtrskim sistemom pri 400-kratni povečavi .....	45
<b>Slika 23:</b> Slika epifluorescentne mikroskopije vzorcev vsebine zadnjega dela prebavnega trakta <i>P. anguinus</i> PT <sub>28/10/08</sub> obdelanega s FISH s sondom SimN-Cy3 in barvanega s FITC v istem vidnem polju, pod različnim filtrskim sistemom pri 400-kratni povečavi.....	45
<b>Slika 24:</b> Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca <i>P. anguinus</i> P194 <sub>27/07/09</sub> obdelanega s FISH s sondom SimN-Cy3 in barvanega s FITC v istem vidnem polju, pod različnim filtrskim sistemom pri 400-kratni povečavi .....	46
<b>Slika 25:</b> Primerjava strukture bakterijske 16S rDNK knjižnice nepigmentiranega močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ) in črnega močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ).....	49

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Vzorci vsebine prebavnega trakta in fecesa močerila uporabljeni v diplomski nalogi .....	13
<b>Preglednica 2:</b> V diplomski nalogi uporabljeni začetni oligonukleotidi.....	17
<b>Preglednica 3:</b> Osnovni PCR protokoli.....	18
<b>Preglednica 4:</b> Nukleotidne sekvence uporabljenih oligonukleotidnih sond .....	21
<b>Preglednica 5:</b> Število 16S rDNK sekvenc iz vsebine prebavnega trakta močerila in fecesa črnega močerila, ki smo jih pridobili v tej študiji.....	31
<b>Preglednica 6:</b> Lastnosti začetnega oligonukleotida SimN (14/09/2011).....	40

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Specifični začetni oligonukleotidi pridobljeni s programom Primrose  
(Ashelford in sod., 2002)

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid (angl. <i>cetyl trimethylammonium bromide</i> )
Cy3	cianin-3
dATP	2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat
dCTP	2'-deoksicitidin-5'-trifosfat
DDBJ	Japonska zbirka podatkov (angl. DNA <i>Data Bank of Japan</i> )
dGTP	2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid, DNA</i> )
dTTP	2'-deoksitimidin-5'-trifosfat
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina (angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EMBL	Evropski molekularno-biološki laboratorij (angl. <i>European Molecular Biology Laboratory</i> )
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (angl. <i>fluorescence in situ hybridization</i> )
FITC	fluorescin izotiocianat (angl. <i>fluorescein isothiocyanate</i> )
INSDC	Mednarodna podatkovna baza nukleotidnih zaporedij (angl. <i>International Nucleotide Sequence Database Collaboration</i> )
LB	gojišče Luria-Bertani
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MPN	metoda ugotavljanja najverjetnejšega števila mikroorganizmov (angl. <i>most probable number</i> )
MS 222	m-aminobenzoat metasulfonske kisline (angl. <i>tricaine methanesulfonate</i> )
PBS	fosfatni pufer (angl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PI	propidijev jodid (angl. <i>propidium iodide</i> )
PA	skupina sekvenc bakterij izoliranih iz prebavnega trakta ali fecesa <i>Proteus anguinus</i> oziroma <i>Proteus anguinus parkelj</i>
RDP II	Ribosomal Database Project II
RNK	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid, RNA</i> )
rRNK	ribosomska RNK (angl. <i>ribosomal RNA, rRNA</i> )
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
VNC	živo, a se ne da gojiti (angl. <i>viable but not culturable</i> )

## 1 UVOD

Človeška ribica ali močeril (*Proteus anguinus*) je največji poznani jamski vretenčar, za katerega je značilno življenje v specifičnem jamskem okolju, dolga življenjska doba in zmožnost preživetja dolgotrajnega stradanja. Zaradi teh lastnosti je močeril že od nekdaj zanimiv objekt raziskav. Znanstvenike zanima med drugim kaj močerilu omogoča preživetje neugodnih razmer. Največkrat so njegove sposobnosti preživetja povezovali z evolucijsko prilagodljivostjo na okolje in razmere v njem. Po mnenju nekaterih znanstvenikov je glavni vzrok svojstven metabolism. V zadnjih letih znanstveniki odkrivajo tudi, kako pomembni so za gostitelja mikroorganizmi, ki naseljujejo prebavni trakt. Prebavna mikrobiota ima namreč pomembno funkcijo pri mnogih procesih, ne le pri razkroju hrane in obrambi pred nezaželenimi mikroorganizmi.

### 1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge smo želeli podrobnejše spoznati mikrobno združbo prebavnega trakta močerila, o kateri doslej ni še nobenih dostopnih zapisov. Ker vemo, da večine mikroorganizmov, ki živijo v kompleksnih ekosistemih, kot je prebavni trakt živali, ne znamo gojiti v laboratorijskih razmerah, smo se odločili, da bomo pri našem delu uporabili predvsem molekularno biološke metode, ki temeljijo na neposrednem odkrivanju in analizi mikrobne DNK. Pri tem smo predpostavljal, da:

- je mikrobna združba prebavnega trakta močerila pestra in jo sestavlja veliko število bakterijskih in morda tudi arhejskih vrst;
- sodi precejšen del mikroorganizmov, ki naseljujejo prebavni trakt močerila v doslej še neopisane vrste in morda tudi višje taksonomske enote;
- bomo lahko na podlagi analize pridobljenih ribosomskih sekvenc pripravili specifične oligonukleotidne sonde za dominante populacije in z metodo fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) te organizme v vzorcih prebavnega trakta močerila tudi zaznali.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KRATEK ZGODOVINSKI PREGLED OPISOV IN RAZISKAV ČLOVEŠKE RIBICE ALI MOČERILA

Prvi znani pisni vir, ki omenja močerila, je Slava vojvodine Kranjske, ki jo je leta 1689 napisal Janez Vajkard Valvasor. Močerila je opisal kot zmajevega mladiča. Žiga Zois je leta 1807 v tedniku "Laibacher Wochenblatt" kot prvi močerila poimenoval kot belo ribo ali "zhloveshka riba" (Aljančič, 1989; Shaw, 1999). Leta 1768 je močerila avstrijski znanstvenik Joseph Nicolas Laurenti opisal v svoji knjigi "Synopsis reptilium" in mu dal znanstveno ime *Proteus anguinus* Laurenti 1768 (Sket, 2007; Južnič, 2006). Z objavami v revijah in knjigah se je zanimanje za močerila močno povečalo. Med drugim ga je leta 1859 v knjigi "The Origin of Species" omenil tudi Charles Darwin, ki je njegovo preživetje v jamah pripisal zmanjšani kompeticiji med vrstami v jamah (Shaw, 1999).

### 2.2 MOČERIL (*Proteus anguinus*)

Močeril spada med dvoživke, v družino močerilarjev (*Proteidae*) in je največja poznana jamska žival na svetu (Aljančič G. in Aljančič M., 1998; Bulog 1994). Naseljuje jamske vode s temperaturo med 8 in 14 °C.

Od leta 1689 je bilo opisanih približno 250 lokacij, na katerih so opazili močerila. Vse so na območju dinarskega krasa v Italiji (med Trstom in Gorico), jugozahodni in južni Sloveniji, jugozahodni in južni Hrvaški ter Bosni in Hercegovini. Število osebkov in njihove lokacije se spreminja zaradi posega človeka v jamsko okolje in onesnaženja (Sket, 1997; Culver, 2005). Močeril je edini poznani jamski vretenčar v Evropi. Zaradi spretnega spopadanja z ekstremnim okoljem je močeril dober modelni organizem in predmet raziskav že vrsto let (Bulog, 1994; Shaw, 1999; Hervant in sod., 2001b).

Ima valjast trup s kratkim repom, ki je od strani sploščen in obrobljen s kožno plavutjo. Je plenilec (Culver, 2005), ki se prehranjuje z raki in polži ter v času poletne sezone tudi z žuželkami (Bulog, 1994). Kot stalni prebivalec jamskega okolja, se je močeril prilagodil na ekstremno okolje morfološko, fiziološko in metabolno. Pomembna prilagoditev je počasen razvoj, saj odraslost doseže šele med 14 in 18 letom, živi pa več kot 60 let (Hervant in sod., 2001b). Zanj je značilna tudi manjša poraba kisika, zmanjšana aktivnost in upočasnjen metabolizem (Hervant in sod., 2001a, 2001b). Sposoben je preživeti dolgotrajno stradanje tudi do več let (Bizjak Mali in Bulog, 2004; Hervant in sod., 2001a, 2001b).

Za večino dvoživk je značilna metamorfoza, v kateri se iz vodne ličinke, ki diha s škrgami, razvije odrasla kopenska žival, ki diha s pljuči. Pri močerilu metamorfoza ne poteče do

konca, ampak spolno dozori že kot ličinka, kar imenujemo neotenija. Močeril diha predvsem z zunanjimi škrgami, če pa je v vodi malo kisika, se poveča vloga preprostih pljuč (Aljančič in sod., 1993; Bulog, 1994; Hervant in sod., 2001b).

Leta 1986 je bil odkrit črn primerek močerila, ki pa ni le potemnjen nepigmentiran močeril, ampak je primer podvrste. Črni močeril se od nepigmentiranega ne razlikuje le po barvi, ampak ima poleg spremenjene zunanje tudi drugačno notranjo zgradbo telesa (Aljančič in sod., 1993).

### 2.2.1 Podvrste močerila

Kot smo že omenili, obstaja poleg nepigmentiranega močerila tudi črni močeril, ki se od nepigmentiranega razlikuje v več lastnostih. Znanstveno ime črnega močerila je *Proteus anguinus parkelj*. Živi v podzemlju v ožji okolici Črnomlja in je belokranjski endemit (Aljančič in sod., 1993; Sket, 1997).

Najbolj očitna razlika je v obarvanosti kože, ki je pri črnem močerilu temna. Črni močeril ima v primerjavi z nepigmentiranim krajšo glavo, noge in rep ter daljši trup. Razlikujeta se tudi po številu zob, saj ima črni močeril v krajšem gobcu okoli 130 zob, medtem ko jih ima običajen močeril do 190. Lobanjske kosti so pri črnem močerilu kraje in širše. Vretenca v repu črnega močerila so ne le drugačna od nepigmentiranega močerila, ampak se razlikujejo tudi znotraj podvrste črnega močerila. Zelo pomembna je razlika v zgradbi očesa, saj ima črni močeril neprimerno bolj razvito oko od nepigmentiranega. Pri belem močerilu je oko približno polovico manjše, pokrneno in prekrito z normalno kožo. Bolj razvito oko črnega močerila prekriva dobro razvita prozorna roženica. Zgradba zrkla je skoraj normalna z dobro razvito mrežnico. Vek ali podobnih gub nima, kar je podobno kot pri daljnem sorodniku močerila (nektur) (Aljančič in sod., 1993; Sket, 1993). Zaradi krajšega gobca ima črni močeril zmanjšano površino vohalnega organa in drugih čutil na sprednjem delu glave. V primerjavi z navadnim močerilom se zato slabše orientira v temnem jamskem okolju. Posebnost črnega močerila je tudi, da ne beži od svetlobe, ampak glavo proti njej obrača (Istenič, 1987).

## 2.3 STRUKTURA PREBAVNEGA TRAKTA MOČERILA

Prebavni trakt dvoživk, med katere uvrščamo tudi močerila (Bulog, 1994), ima relativno preprosto strukturo. Sestavlja ga usta, požiralnik, želodec, tanko črevo, debelo črevo in kloaka (Stevens in Hume, 2004).



**Slika 1: Prerez telesa močerila z vidnim prebavnim traktom (Configliachi in Rusconi, 1818: 119)**

Ker je znano, da je za močerila značilna neotenija, se bom pri opisu prebavnega trakta osredotočila na opis strukture prebavnega trakta, kot je značilen za ličinke dvoživk (Bulog, 1994).

Vloga ustne votline pri ličinkah je lov hrane in njena "priprava". Pri ličinkah nekaterih dvoživk je opisan filtrirni sistem, ki omogoči ločevanje majhnih delcev od večjih (Stevens in Hume, 2004). Močeril ima majhno ustno votlino z drobnimi zobmi, ki so nameščeni kot rešeto in zadržijo večje delce. Kljub zobem pa močeril hrane ne žveči, temveč jo požira celo (Deban in sod., 2001). Ustni votlini sledi požiralnik, po katerem hrana potuje do preprostega želodca. V želodcu se sproščata pepsinogen in HCl, ki omogočata začetno razgradnjo hrane, predvsem beljakovinskega dela. Delno razgrajena hrana potuje naprej do tankega črevesa, kjer poteka glavna razgradnja ogljikovih hidratov, maščob in proteinov. Končni produkti razgradnje se nato absorbirajo preko površine tankega črevesa (Stevens in Hume, 2004), katerega površina je tudi pri močerilu povečana s črevesnimi resicami (Bizjak Mali in Bulog, 2004). Prebavna vsebina potuje naprej do debelega črevesa, ki ga pri ličinkah težko ločimo od tankega črevesa, saj ni bistvene razlike v obliki. Prebavna cev je zaključena s kloako (Stevens in Hume, 1998, 2004).

## 2.4 POMEN BAKTERIJ V PREBAVNEM TRAKTU

Prebavni trakt sodi med najbolj prilagodljive organe v organizmu. Ima ključno vlogo pri prehranjevanju in fiziologiji živali ter pomembno funkcijo pri razvoju in delovanju njenega imunskega sistema (Zoetendal in sod., 2004). Ena najpomembnejših lastnosti prebavnega trakta je simbiontski odnos med mikroorganizmi, ki ga naseljujejo, in gostiteljem. Število in vrsta mikrobov je odvisna od vrste hrane, strukture in pH prebavnega trakta ter časa, ki je potreben za prehod hrane. Tako npr. nizek pH in hiter prehod hrane skozi prebavni trakt preprečujeja prisotnost ter rast nekaterih mikrobov (Stevens in Hume, 1998; Zoetendal in sod., 2004).

V prebavnem traktu večine živali je prisotna kompleksna mikrobna združba sestavljena iz bakterij, arhej, praživali, kvasovk in bakteriofagov (Zoetendal in sod., 2004). Različne dele prebavnega trakta naseljujejo različne populacije mikroorganizmov. Razlika obstaja tudi med bakterijami, ki živijo v prebavnem traktu in tistimi, ki jih odkrijemo v iztrebkih. Indigene bakterije prebavnega trakta fermentirajo ogljikove hidrate v kratkoverižne maščobne kisline, ki služijo kot vir energije in lajšajo absorpcijo natrija ter vode. Pomembna lastnost teh mikroorganizmov je tudi zmožnost transformacije dušikovih komponent v amoniak in mikrobne proteine ter sinteza vitaminov B (Stevens in Hume, 1998).

Danulat (1986) je v prebavnem traktu morske ribe polenovke (*Gadus morhua*), katere glavna hrana so žuželke in raki, pokazal, da so za razgradnjo hitina odgovorne hitinolitične bakterije, ki naseljujejo ribji prebavni trakt. Močeril je plenilec, ki se med drugim prehranjuje tudi z žuželkami. Ali je za razgradnjo hitina odgovoren sam močeril ali bakterije, ki naseljujejo njegov prebavni trakt ali pa razgradnja hitina sploh ne poteka in ga močeril izloča iz telesa, so vprašanja na katera zaenkrat še ni bilo odgovorjeno.

V predhodnih raziskavah so v srednjem delu prebavne cevi pri močerilih pogosto odkrili nematode, katerih prisotnost je odvisna predvsem od letnega časa (Bulog, 1994). Znano je, da lahko nematodi vplivajo na fiziologijo prebavnega trakta in tako na samo delovanje prebavil (Khan in Collins, 2005). Kako pa nematodi vplivajo na močerila ali na mikrobnou združbo v prebavnem traktu, do danes še ni bilo raziskano.

## 2.5 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE PREBAVNEGA TRAKTA ŽIVALI

### 2.5.1 Tradicionalne mikrobiološke metode za preučevanje mikrobnih združb

Izbira metod, s katerimi bi želeli opisati mikrobno združbo v nekem vzorcu, je pomembna in ključna za dobre rezultate. Odločiti se je potrebno med t.i. gojitvenim in molekularnim pristopom (Wagner in sod., 1993). Za razliko od živali in rastlin je morfologija mikroorganizmov zelo preprosta. Medtem ko pri prvih dveh lahko ločimo eno vrsto od druge po morfoloških značilnostih, to pri mikroorganizmih ni možno. Zato je bila do nedavnega za mikrobiološko identifikacijo potrebna izolacija čistih kultur, čemur je sledilo ugotavljanje fenotipskih, to je večinoma biokemijskih in fizioloških lastnosti (Amann in sod., 1995; Wallner in sod., 1993), pa še to je pogosto omogočalo le identifikacijo do rodu, ne pa vrste.

Gojenje mikroorganizmov poteka na primerem gojišču z dodanim virom ogljika in drugimi viri energije. Ker so vsa gojišča bolj ali manj selektivna, vseh mikroorganizmov ni mogoče gojiti na isti vrsti gojišča. Poleg identifikacije mikroorganizmov nas zanima tudi pestrost mikrobne združbe v določenem okolju. Gojenje mikroorganizmov in njihovo štetja v tem primeru ne dajo zanesljivih rezultatov. Boljše rezultate od preprostega štetja kolonij na ploščah lahko dosežemo s tehniko MPN ("most-probable-number"). Zaradi uporabe serijskih redčitev vzorca na primerem gojišču, tehnika MPN omogoča večjo natančnost in ponovljivost rezultatov (Roszak in Colwell, 1987).

Izolacija čistih mikrobnih kultur na agarskih ploščah ima še mnoge druge pomanjkljivosti. Gojišča za gojenje bakterij so ponavadi v sestavi bogata s hranili, medtem ko so marsikatera naravna okolja revna (npr. jamsko okolje). Mikroorganizmi iz revnih okolij so se na pomanjkanje hranil prilagodili z zelo učinkovitim mehanizmom črpanja hranil iz okolja. Ko takšni mikrobi pridejo v okolje, ki je bogato s hranili, teh mehanizmov ne morejo izklopiti, kar lahko vodi v smrt zaradi osmotskega stresa (Barton, 2006). Danes je znano, da vseh mikroorganizmov ni mogoče gojiti na gojiščih, saj pri vseh bakterijah iz okolja ne poznamo rastnih zahtev, kar predstavlja oviro za njihovo gojenje. Poznamo pa tudi bakterije, ki jih opisujemo s frazo "viable but non-culturable" (VNC). Značilnost takih bakterij je, da so nezmožne rasti in tvorbe kolonij na gojiščih, ki so primerna za njihovo rast, a so žive in metabolno aktivne. Bakterije navadno preidejo v fazo VNC zaradi spremembe rastnih pogojev na gojišču (Oliver, 2005; Duncan in sod., 1994).

### 2.5.2 Molekularne metode za preučevanje mikrobnih združb

V nasprotju z mikroorganizmi, za katere je značilna majhna morfološka raznolikost, je molekularna raznolikost proteinov in nukleinskih kislin velika. Identifikacijo mikroorganizmov je zato mogoče doseči z analizo in primerjavo makromolekul, v praksi

najpogosteje ribosomskih rRNK molekul (Woese, 1987) in to tudi neposredno v okoljskih vzorcih. Preučevanje okoljskih vzorcev na osnovi analize nukleinskih kislin se je začelo pred približno četrt stoletja z analizo genov molekule 5S rRNK. Ker so bili le te majhne, so bile primerne zgolj za preučevanje vzorcev iz manj kompleksnih ekosistemov (Amann in sod., 1995), rezultati pa precej nezanesljivi. Olsen in njegovi sodelavci (1986) so predlagali analizo molekul 16S rRNK in 23S rRNK, kar je omogočilo raziskovanje bolj kompleksnih združb (Lane in sod., 1985). Dandanes se največkrat uporablja 16S rRNK, ker je le nekaj manjša in jo je bilo v takratnem obdobju bistveno lažje analizirati. Pomembne lastnosti gena za 16S rRNK oziroma ribosomske molekule so še ubikvitarnost, prisotnost variabilnih in evolucijsko ohranjenih regij v sekvenci, odsotnost horizontalnih prenosov, veliko število ribosomov oziroma tarč v celici in kot posledica izbora za t.i. "zlati standard" veliko število dostopnih sekvenc za primerjalne analize (Amann in Ludwig, 2000).

Z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) je preučevanje mikrobnih združb postalo hitrejše. PCR namreč omogoča pomnoževanje določenih delov mikrobine DNK neposredno iz okoljskih vzorcev ter zagotavlja zadostno količino nukleinskih kislin za samo preučevanje (Amann in sod., 1995; Saiki in sod., 1988).

Zaradi vse večjega števila odkritih ribosomskih sekvenc in potrebe po učinkovitem hranjenju vseh sekvenc so nastale javno dostopne podatkovne zbirke (GenBank, EBI, itd.). Ker je večina podatkovnih zbirk dostopna preko spleta, je uporaba le teh neodvisna od kraja in časa. Obdelava pridobljenih sekvenc poteka z računalniškimi programi, ki so v večini primerov tudi prosto dostopni na spletu. S tem je sama analiza in interpretacija rezultatov postala cenejša in hitrejša.

Analiza ribosomskih RNK sekvenc je torej neodvisna od sposobnosti izolacije in gojitve in predstavlja alternativo tradicionalnim postopkom k identifikaciji posameznih mikroorganizmov in k opisu kompleksnih mikrobnih združb. Ne more pa popolnoma nadomestiti gojivnih tehnik, s katerimi lahko mikroorganizme izoliramo iz okolja, jih nato podrobno preučimo in včasih tudi ugotovimo, kakšno funkcijo imajo v njem (Amann in sod., 1995; Head in sod., 1998).

#### 2.5.2.1 Pridobivanje sekvenc iz okoljskih vzorcev

Uspešna izolacija skupne mikrobine DNK iz vzorca je predpogoj za uspešno molekularno biološko preiskavo. Izolacija skupne mikrobine DNK je uspešna, ko dobimo zadostno količino čiste in kakovostne DNK, na kar pa vplivajo vrsta in količina biološkega materiala, iz katerega se izolira skupna mikrobitna DNA ter izolacijska metoda, ki se pri tem uporabi.

Pred izolacijo DNA iz vzorca lahko z določenimi obogatitvenimi tehnikami povečamo število vseh mikroorganizmov ali le tistih z določenimi lastnostmi. Mehanizem selekcije

lahko temelji na prehranskih, fizikalnih ali kemijskih lastnostih, izmed katerih je najpogosteje uporabljena rast na določenem substratu. Čeprav praviloma z obogatitvenimi tehnikami izgubimo velik del populacije zaradi hitre rasti določenih vrst, pa je možno to izgubo zmanjšati z blago stopnjo obogatitve pod strogimi pogoji (Cowan in sod., 2005).

Pomnoževanje genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) je naslednji korak, ki vodi k pripravi klonske knjižnice. Za dobre rezultate mora biti protokol PCR reakcije primerno izbran, kakor morajo biti primerni tudi začetni oligonukleotidi. Kljub temu pa ima PCR dve pomembni slabosti. Prva je sama nukleotidna sestava začetnih oligonukleotidov. Ta je sestavljena glede na sekvence že znanih mikroorganizmov, zaradi česar je onemogočeno odkrivanje novih mikrobov (Cowan in sod., 2005). Druga slabost je možen nastanek hibridnih molekul ali t.i. himernih sekvenc. Na splošno velja za reakcijo PCR, da se količina tarčne DNK z vsakim ciklom reakcije PCR podvoji. Dejansko pa koncentracija podvojene DNK najprej narašča eksponentno, kasneje pa postopoma vstopi v fazo, v kateri prihaja do prezgodnje terminacije verig zaradi zmanjšanja količine reagentov (Wang C.-Y. in Wang Y., 1996). Eden izmed dejavnikov, ki vpliva na nastanek himernih sekvenc, je število ciklov reakcije PCR. Z naraščanjem števila ciklov, narašča tudi število nastalih himernih sekvenc. Podobnost oziroma sorodnost med posameznimi sekvencami tudi poveča možnost nastanka himernih sekvenc (Wang C.-Y. in Wang Y., 1997). Nastanek himernih sekvenc je odvisen tudi od razgrajenosti molekule DNK. Ob uporabi visokomolekularne DNK je možnost nastanka himernih sekvenc manjša, kot pri uporabi fragmentov različnih velikosti (Liesack in sod., 1991). Rezultate reakcije PCR je zato priporočljivo preverjati s programi za odkrivanje himer, kot so prosto dostopni programi na spletni strani Greengenes (DeSantis in sod., 2006).

### 2.5.2.2 Sekvenciranje in analiza sekvenc

Leta 1977 je Sanger s sodelavci razvil tehniko za ugotavljanje nukleotidne sekvence DNK (Sanger in sod., 1977). Sekvenciranje po Sangerju temelji na sintezi DNK verige z dodajanjem deoksinukleotidov in dideoksinukleotidov. Ker dideoskinukleotidom manjka ena OH skupina na sladkorju, le ti ne morejo tvoriti fosfodiesterske vezi z naslednjim nukleotidom v verigi in sinteza novonastale DNK molekule se ustavi. Nastanejo fragmenti različnih velikosti, ki se jih po Sangerjevi metodi analizira z elektroforezo. Dideoksinukleotidi so bili sprva označeni radioaktivno z enakim izotopom, zato so reakcije potekale v ločenih reakcijskih mešanicah. Kasneje so začeli posamezne dideoksinukleotide označevati z različnimi fluorescentnimi barvili, kar je omogočilo reakcijo z vsemi štirimi dideoksinukleotidi v isti reakcijski mešanici (Sanger in sod., 1977; Prober in sod., 1987) in avtomatizacijo postopka.

Z razvojem tehnologije pridobivanja nukleotidnih sekvenc so raziskovalci razvili tudi več računalniških programov za obdelavo sekvenc. Eden izmed takih programov je programski paket MEGA (ang. Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Omogoča poravnave

sekvenc, rekonstrukcijo in prikaz filogenetskih dreves ter ocenjevanje evolucijskih distanc in je prosto dostopen na spletu (Tamura in sod., 2007).

Podobno kot MEGA, tudi programi na spletni strani RDP (ang. The Ribosomal Database Project) omogočajo določene analize nukleotidnih sekvenc. Prosto dostopni programi na tej spletni strani raziskovalcem omogočajo preverjanje ustreznosti ribosomskih sond z orodjem ProbeMatch, identifikacijo najbolj sorodnih sekvenc iz baze podatkov z orodjem SequenceMatch in umestitev novih sekvenc v obstoječo bazo podatkov z orodjem RDP Classifier (Cole in sod., 2005). Sekvence genov za 16S rRNA v internetni bazi podatkov RDP II so posodobljene mesečno, in sicer iz INSDC (ang. International Nucleotide Sequence Database Collaboration), ki združuje tri največje podatkovne baze: DDBJ (ang. DNA Data Bank of Japan), EMBL (ang. The European Molecular Biology Laboratory) in GenBank (Cole in sod., 2009).

#### 2.5.2.3 Fluorescentna *in situ* hibridizacija

Med pomembnejše tehnike, ki omogočajo istočasno odkrivanje in prepoznavanje mikroorganizmov v okoljskih vzorcih spada tudi fluorescentna *in situ* hibridizacija. Tehniko sta leta 1969 neodvisno razvili dve raziskovalni skupini (Pardue in Gall, 1969; John in sod., 1969). Dve desetletji kasneje je Giovannoni s sodelavci (1988) metodo prvič uspešno uporabil za odkrivanje bakterij, ko je z radioaktivno označenimi sondami mikroskopsko zaznal bakterije v vzorcu (Moter in Göbel, 2000).

Fluorescentna *in situ* hibridizacija je tehnika, pri kateri uporabljamo z barvili označeno DNK sondu s točno določeno nukleotidno sekvenco, ki se specifično veže na tarčno zaporedje na celičnih ribosomih. Postopek je sestavljen iz šestih korakov: fiksacije vzorca, predpriprave vzorca za hibridizacijo, hibridizacije vzorca z oligonukleotidno sondou, spiranja in s tem odstranjevanje nevezane sonde, vizualizacije in dokumentiranja rezultatov (Moter in Göbel, 2000).

Prvi korak *in situ* hibridizacije je fiksacija vzorca. Pri tem membrana postane prepustna, kar olajša prehod z barvilm označene sonde v celico. Postopek tudi zaščiti RNK molekule pred njihovo razgradnjo s strani endogenih encimov. Sama fiksacija je pomemben korak, ki pa ga je težko optimizirati. Rezultat optimalnih pogojev bi bil dober prehod sonde v celico, ohranitev tarčne RNK in vzdrževanje integritete ter morfoloških podrobnosti celice (Moter in Göbel, 2000). Na splošno je po Gramu negativne bakterije najboljše fiksirati s 3–4 % formaldehidom ali paraformaldehidom, medtem ko je za fiksacijo po Gramu pozitivnih bakterij najboljše uporabiti 50 % etanol ali mešanico etanola in formaldehida (Roller in sod., 1994).

Fiksaciji sledi vezava celic na objektno stekelce, kjer se uporablja predvsem objektna stekelca, ki so že prevlečena s snovjo, ki pospešuje vezavo celic. Ponavadi je postopek

vezave sestavljen iz prenosa fiksiranih celic na objektno stekelce, sušenja in dehidracije v seriji etanola (Moter in Göbel, 2000).

Pomemben korak je izbira oligonukleotidne sonde. Le ta mora biti specifična in se mora vezati na točno določeno nukleotidno sekvenco, kateri je komplementarna, ter dovolj občutljiva, da njen signal lahko zaznamo (Moter in Göbel, 2000). Zaradi evolucijske stabilnosti, strukturiranosti iz evolucijsko ohranjenih in variabilnih regij ter velikega števila kopij v celici, v mikrobiologiji za tarčne molekule pri fluorescentni *in situ* hibridizaciji največkrat izbiramo 16S rRNK molekule (Woese, 1987). Tipična oligonukleotidna sonda vsebuje 15 do 30 nukleotidov. Prehod sonde v celico je namreč odvisen od velikosti sonde. Signal zaznamo zaradi barvila, ki je vezan na oligonukleotidno sondu. V začetku so uporabljali predvsem radioaktivno označene sonde, ki pa so jih počasi zamenjala fluorescentna barvila, ki so bolj varna, omogočajo zadovoljiv signal in je potek dela z njimi hitrejši (Moter in Göbel, 2000).

Po izbiri primerne oligonukleotidne sonde sledi postopek hibridizacije. Da se sonda lahko pravilno veže na tarčno sekvenco, mora hibridizacija potekati v kontroliranih pogojih. Bistven korak je uporaba predhodno segretega hibridizacijskega pufra, ki ga skupaj s sondou nanesemo na celice vezane na objektno stekelce. Postopek nato poteka v zatemnjeni vlažni komori, ki ponavadi traja od 30 minut do nekaj ur in poteka pri temperaturi med 37 °C in 50 °C. Po inkubaciji v komori objektna stekelca speremo z destilirano vodo in odstranimo nevezano sondu. Posušena stekelca s hibridiziranimi celicami pregledamo z epifluorescentnim mikroskopom (Moter in Göbel, 2000).

Fluorescentna *in situ* hibridizacija ima tudi določene slabosti. Soočamo se z lažno pozitivnimi ali negativnimi rezultati. Lažne pozitivne rezultate lahko dobimo zaradi avtofluorescence, ki jo oddajajo nekatere bakterije, arheje, kvasovke in plesni, kot tudi material, ki le te obdaja (blato, rastline, pitna voda). Nepravilne rezultate lahko dobimo tudi zaradi majhne specifičnosti oligonukleotidne sonde. Pri izbiri in konstrukciji sonde je zato pomembno, da je le ta čim bolj specifična (Moter in Göbel, 2000). Lažne negativne rezultate lahko dobimo v primeru slabe penetracije sonde, kar je vezano na strukturo celične stene (Wallner in sod., 1993; Moter in Göbel, 2000). Enako lahko dobimo nepravilne rezultate zaradi terciarne strukture rRNK in s tem oteženega naleganja sonde. rRNK v celici ima lahko zanke ali je vezana na proteine, zaradi česar niso dostopni vsi deli sekvence (Moter in Göbel, 2000). Problemi lahko nastanejo tudi zaradi nizke vsebnosti rRNK v celici, saj njena količina ne variira le med vrstami, ampak tudi med posameznimi celicami ista vrste. Količina rRNK v celici je odvisna od fizičnega stanja celic oziroma stopnje rasti (Wallner in sod., 1993; Moter in Göbel, 2000). Slaba lastnost fluorescence je tudi da sčasoma bledi. Upadanje fluorescence lahko vodi v nepravilne negativne rezultate (Moter in Göbel, 2000). Bledenje lahko upočasnímo z uporabo sredstev proti bledenju (npr. citifluor).

Najprimernejša kontrola napačnih negativnih rezultatov je uporaba bakterijske sonde, ki prepozna vse bakterije. Pa vendar je Daims s sodelavci (1999) pokazal, da najbolj pogosto uporabljena splošna sonda Eub338 ne zazna bakterij iz debel *Planctomycetales* in *Verrucomicrobia*. Zato je priporočljivo pri preverjanju negativnih rezultatov uporabiti ne le eno, ampak več bakterijskih sond (Motter in Göbel, 2000).

### 3 MATERIALI IN METODE

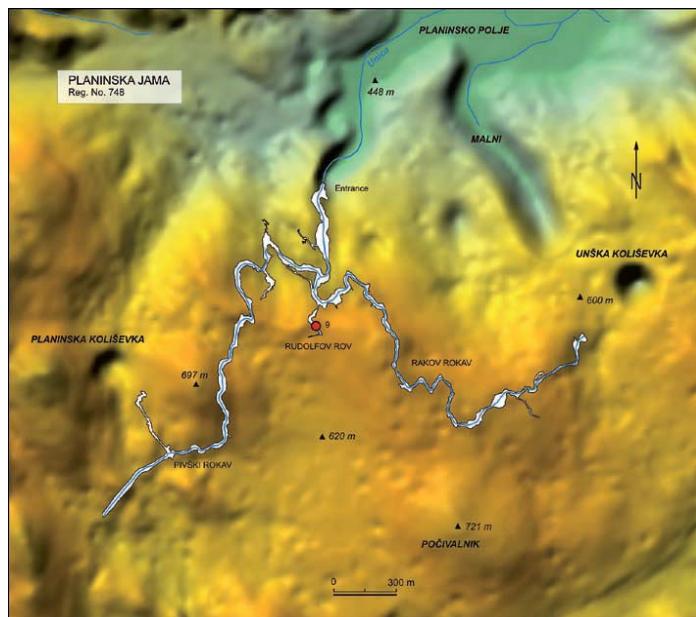
#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kras in jame

Kras je kamnito ozemlje, ki je nastalo zaradi specifičnega vpliva vode na apnenec. Značilnosti krasa so posebne površinske oblike, jame in podzemeljski vodni tok (Aljančič in sod., 1993). Kraške jame so ekstremna okolja brez svetlobe, z visoko vlažnostjo, nizko in stabilno temperaturo ter relativno nizkim vnosom hranil. Glavni dotok vode v jame predstavljajo reke, ki s tokom prinašajo tudi hranila. Pomemben je tudi dotok vode preko sten, skozi katere voda pronica iz površja. Na slabe življenske razmere so prilagojena tudi živa bitja, ki v njih prebivajo (Mulec in sod., 2002).

###### 3.1.1.1 Planinska jama

Planinska jama je kraška jama, ki leži na južnem delu Planinskega polja ob naselju Planina in obsega 6656 m podzemnih rovov. Reka Pivka jo povezuje s Postojnsko jamo in reka Rak z Rakovim Škocjanom (Zupan in sod., 2008).



Slika 2: Planinska jama (Zupan Hajna in sod., 2008: 74).

Sestavlja jo več stranskih rovov, v katerih so večje količine jamskih sedimentov, predvsem naplavini reke Pivke. Ena od lastnosti jame je tudi visoka biotska raznovrstnost, saj je

pomemben habitat močerila in drugih živali, kot so postranica (*Niphargus*), jamski ježek (*Monolistra*), jamska kozica (*Troglocaris anophthalmus*), jamski vodni osliček (*Asellus aquaticus* L.) in jamska mokrica (*Titanethes sp.*) ter drugi (Aljančič in sod., 1993; Sket, 1999).

### 3.1.2 Vzorci

Močeril je bil ujet 27/10/2008 v Planinski jami. Vzorec vsebine prebavnega trakta je pripravila asist. dr. Lilijana Bizjak Mali z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, ki je ujetega močerila (*Proteus anguinus*) secirala. Zamrznjenemu vzorcu smo dodali 500 µL PBS, pH 7,4, ga odtalili na sobni temperaturi in suspenzijo dobro premešali. Resuspendiran vzorec smo nato razdelili na štiri dele in jih do nadaljnje uporabe ponovno zamrznili. Analizirali smo tudi vzorce fecesov dveh primerkov, in sicer navadnega močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*), ki sta živela v ujetništvu na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

**Preglednica 1: Vzorci vsebine prebavnega trakta in fecesa močerila uporabljeni v diplomski nalogi.**

<sup>a</sup> Oznaka vzorca	Lastnosti vzorca
PT <sub>28/10/08</sub>	Vsebina preb. trakta močerila iz Planinske jame
P194 <sub>03/11/08, 11/06/09, 15/06/09, 02/07/2009, 10/09/09, 27/07/09</sub>	Feces močerila v ujetništvu (ulovljen v Planinski jami)
Č16 <sub>26/06/09, 27/05/09, 26/08/10, 17/11/09</sub>	Feces črnega močerila v ujetništvu
7192 <sub>20/10/08</sub>	Feces navadnega močerila v ujetništvu
Tular maj 2009	Vzorec fecesa močerila (jamski laboratorij Tular)

<sup>a</sup> datum poleg kratic pomeni dan odvzema vzorca

### 3.1.3 Kompleti

- Komplet za izolacijo in čiščenje nukleinskih kislin iz agaroznega gela: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Frankfurt, Nemčija)
- Komplet za kloniranje PCR produktov: CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas MBI, Litva)

### 3.1.4 Raztopine in pufri

IME	SESTAVA
Pufer TE, pH 8,0	10Mm Tris-HCl, pH 8,0 1mM EDTA, pH 8,0
Pufer PBS, pH 7,4	137 mM NaCl, pH 7,4 2,7 mM KCl, pH 7,4 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Pufer TBE 0.5×	0,045 M Tris-borat 0,001 M EDTA, pH 8,0
CTAB/NaCl	10 % (ut.) heksadeciltrimetil amonijev bromid 0,7 M NaCl
Fiksacijska raztopina	4 % (ut.) paraformaldehid (PFA) v PBS pH 7,4
Hibridizacijski pufer	0,9 M NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 0,01 % SDS
Barvilo fluorescin	1 mg FITC (fluorescin isothiocyanate) isomer I, raztopljen v 0,5 ml acetona (100 %)

### 3.1.5 Gojišča

Recept za pripravo 1 litra gojišča LB (Luria-Bertani):

- Tripton: 10 g
- Kvasni ekstrakt: 5 g
- NaCl: 10 g
- dH<sub>2</sub>O do 1000 ml

Soli smo postopoma raztoplili v 1000 ml dH<sub>2</sub>O (Bertani, 1951). Ker smo pripravili agarske plošče, smo dodali še 15 g agarja (na liter gojišča). Gojišče smo raztoplili, avtoklavirali, ustrezno ohladili, dodali ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml in ga razlili v plošče.

Recept za pripravo 1 litra gojišča LB *freezing buffer* (pH 7,5):

- Bacto tripton: 10 g
- Kvasni ekstrakt: 5 g
- NaCl: 10 g

- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 6,3 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,8 g
- C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>\*2H<sub>2</sub>O: 0,5 g (Na-citrat dihidrat)
- MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O: 1 g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,9 g
- Glicerol: 44 ml
- dH<sub>2</sub>O do 1000 ml

Soli smo postopoma raztopili v 1000 ml LB. Odmerili smo 956 ml raztopine v svežo stekleničko in dodali 44 ml glicerola. Gojišče smo dobro premešali in po sterilizaciji dodali še ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml (Zimmer in Gibbins, 1997).

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Sekcija močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in odvzem vsebine prebavnega trakta

Ujetega močerila smo dan po ujetju v Planinski jami uspavali s potopitvijo v raztopino 0.3 % MS 222 (m-aminobenzoat metasulfonske kisline ali tricaine methane sulfonate, Sigma) in ga dekapitirali. Sledila je sekcija. Prebavni trakt močerila je tehtal 1,079 g, kar predstavlja 6,4 % celotne teže močerila (16,865 g). Največ prebavne vsebine je bilo v debelem črevesju, iz katerega smo jo s sterilno pinceto iztisnili v mikrocentrifugirko in zamrznili na -20 °C. V prebavnem traktu močerila smo odkrili tudi nematode, ki so bili pritrjeni na notranjo steno tankega črevesja.

#### 3.2.2 Izolacija skupne mikrobne DNK

Vzorec smo centrifugirali 5 minut pri 8000 × g in odstranili supernatant. Dodali smo 1 ml pufra TE (pH 8,0) ter resuspendiran vzorec še enkrat centrifugirali 5 minut pri 7000 × g. Supernatant smo odstranili, usedlino pa resuspendirali v 600 µL pufra TE (pH 8,0). Vzorce smo nato homogenizirali z ultrazvokom v sonikatorju Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (ISTCP Inc., New Jersey, ZDA) s tremi cikli po 30 sekund (vmes 15 sekund premora). Homogenizat smo centrifugirali 10 minut pri 12000 × g. Supernatant smo prestavili v novo mikrocentrifugirko in dodali 100 µL 5M NaCl. Vsebino smo premešali na vrtinčnem mešalu in dodali 80 µL 10-odstotnega CTAB v 0.7-odstotnem NaCl, ki je bil predhodno segret na 65 °C. Po 10-minutni inkubaciji pri 65 °C smo izvedli ekstrakcijo nukleinskih kislin z enakim volumnom kloroformna. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 12000 × g, prenos zgornje vodne faze v svežo mikrocentrifugirko in ponovna ekstrakcija z enakim volumnom mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1). Po ponovnem 10-minutnem centrifugiraju pri 12000 × g smo vodno fazo prenesli v svežo

mikrocentrifugirko, raztopljene nukleinske kisline pa oborili z dodatkom 0,6-kratnega volumna izopropanola. Mešanico smo centrifugirali 15 minut pri  $14000 \times g$ , odstranili supernatant, stene mikrocentrifugirke pa sprali z 1 ml ledeno hladnega 70-odstotnega etanola. Ponovno smo centrifugirali 10 minut pri  $14000 \times g$  in odstranili supernatant, medtem ko smo oborjene nukleinske kisline posušili na zraku in jih nato raztopili v 20  $\mu\text{L}$  pufra TE. Raztopino izolirane skupne DNK smo do uporabe shranili pri  $-20^\circ\text{C}$ .

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

Za pomnoževanje genov za 16S rRNK smo uporabili ciklični sistem My cycler<sup>TM</sup>, thermal cycler (BioRAD, ZDA). Reakcijske mešanice smo pripravili v 200  $\mu\text{l}$  mikrocentrifugirkah. Uporabili smo ustrezne začetne oligonukleotide (Preglednica 2). 20  $\mu\text{l}$  reakcijske mešanice so bile sestavljene iz 10-kratnega *Taq* pufra, 2,25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM mešanice deoksinukleotidov (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 2 enot rekombinantne *Taq* polimeraze DNK (Fermentas, ZDA), 4 pmol vsakega začetnega oligonukleotida in 1  $\mu\text{l}$  ustrezno redčene DNK. Na koncu smo volumen reakcijske mešanice dopolnili s sterilno destilirano vodo (Sigma, ZDA). Protokoli za reakcije PCR z različnimi pari začetnih oligonukleotidov so zapisani v razpredelnici Preglednica 3.

**Preglednica 2: V diplomski nalogi uporabljeni začetni oligonukleotidi.**

Začetni oligonukleotid	Specifičnost	Sekvenca (5'-3') začetnega oligonukleotida	Tarčno mesto v genu za 16 S rRNK	Vir
F968	bakterije	AACGCGAAGAACCTTAC	968-984	Nübel in sod., 1996
1401r	bakterije	CGGTGTGTACAAGACCC	1401-1385	Nübel in sod., 1996
F357gc	metanogene arheje	CCCTACGGGGCGCAGCAG	340-357	Watanabe in sod., 2004
691r	metanogene arheje	GGATTACARGATTTCAC	707-691	Watanabe in sod., 2004
Met86f	metanogene arheje	GCTCAGTAACACGTGG	86-101	Wright in Pimm, 2003
Met1340r	metanogene arheje	CGGTGTGTGCAAGGAG	1340-1325	Wright in Pimm, 2003
<sup>a</sup> pJET 1.2f	vektor pJET 1.2	CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC	/	<sup>c</sup> /
<sup>b</sup> pJET 1.2r	vektor pJET 1.2	AAGAACATCGATTTCATGGCAG	/	<sup>c</sup> /
T7 Promoter	promotor bakteriofaga T7 kamor se veže RNK Polimeraza T7	TAATACGACTCACTATAAGGG	/	Ikeda in Richardson, 1986
SimN	<i>Peptostreptococcus incertae sedis</i>	CTCTGTCCTCAAGGAAGAT	~390	To delo
Fd1	bakterije	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27	Weisburg in sod., 1991

<sup>a</sup> pJET 1.2f – pJET 1.2 Forward Sequencing Primer (Fermentas MBI, Litva)

<sup>b</sup> pJET 1.2r – pJET 1.2 Reverse Sequencing Primer (Fermentas MBI, Litva)

<sup>c</sup> pJET začetna oligonukleotida sta del kita CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas MBI, Litva)

**Preglednica 3: Osnovni PCR protokoli.**

Protokol	1	2	3	4	5	6
Začetna oligonukleotida	Fd1, 1401r	F968, 1401r	F357gc, 691r	Met86f, Met1340r	pJET1.2f, pJET1.2r	Fd1, SimN
Specifičnost	bakterije	bakterije	metanogene arheje	metanogene arheje	vektor pJET 1.2	<i>Peptostreptococcus incertae sedis</i>
Dolžina produkta (~ bp)	1393	433	334	1254	/	~ 1011
Začetna denaturacija 94 °C (min)	3	<sup>a</sup> 3	3	3	10	3
Število ciklov	30	35	40	40	25	30
Denaturacija 94 °C (s)	30	<sup>a</sup> 30	60	45	45	30-35
Prileganje 56 °C (s)	45	30	<sup>b</sup> 60	45	45	<sup>c</sup> 30-45
Polimerizacija 72 °C (s)	90	80	180	100	120	90
Podaljšana polimerizacija 72 °C (min)	10	10	10	20	15	10

<sup>a</sup> začetna denaturacija in denaturacija sta potekali pri 95 °C

<sup>b</sup> prileganje začetnih oligonukleotidov je potekalo pri temperaturi 53 °C

<sup>c</sup> prileganje začetnih oligonukleotidov je potekalo pri temperaturah 52 °C, 54 °C in 56 °C

### 3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

PCR pomnožke smo ločevali z agarozno gelsko elektroforezo. Agarozne gele smo pripravili s segrevanjem ustreznega količine agaroze Seakem® LE Agarose (CambreX Bio Science Rochland Inc., Rochland, USA). Uporabljali smo 1-, 1,2- in 1,4-odstotne (ut. %) agarozne gele. Elektroforetsko ločevanje je trajalo 30 do 45 minut v 0,5-kratnem pufru TBE pri napetosti 100 V. Gele smo po končani elektroforezi barvali v raztopini etidijevega bromida koncentracije  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  in jih nato razbarvali v destilirani vodi. Po končanem razbarvanju smo gele pregledali v transiluminatorju Gel Doc 1000 (BioRad, Hercule, ZDA) s sistemom za zajemanje in obdelavo slike Molecular Analyst 1.4 (BioRad, Hercule, ZDA).

### 3.2.5 Priprava kompetentnih celice

Pri kloniranju smo uporabljali kompetentne celice *Escherichia coli* sev TOP10, ki smo jih pripravili po metodi s  $\text{CaCl}_2$ . V tekoče gojišče LB z dodanim streptomycinom smo nacepili bakterijsko kulturo *E. coli* sev TOP10 in jo inkubirali preko noči (~16h) v stresalniku pri  $37^\circ\text{C}$  in frekvenci 225 obratov/min. Naslednji dan smo 0,5 ml kulture prenesli v 50 ml svežega tekočega gojišča LB in inkubirali pri  $37^\circ\text{C}$  in frekvenci 300 stresljajev/min, dokler kultura ni dosegla absorbance ( $\text{OD}_{600}$ ) 0,4 do 0,5. Kulturo smo prenesli v dve predhodno ohlajeni centrifugirki in jih 20 minut inkubirali na ledu. Po 10-minutnem centrifugiranju kulture pri  $4^\circ\text{C}$  pri  $2300 \times g$  smo supernatant odlili in s pipeto odstranili ostanke gojišča. Pelet smo previdno resuspendirali v 10 ml ledeno hladnega 0,1 M  $\text{CaCl}_2$  in inkubirali na ledu 20 minut. Po ponovnem 10-minutnem centrifugiranju pri  $4^\circ\text{C}$  pri  $2300 \times g$  smo supernatant odlili in s pipeto odstranili njegove ostanke. Usedle celice smo resuspendirali v 20 ml 15-odstotne (v/v) raztopine glicerola v 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ . Tako pripravljeni kompetentni celici smo alikvotirali po 100  $\mu\text{l}$  v predhodno ohlajene sterilne mikrocentrifugirke in jih hipno zamrznili v absolutnem etanolu ohljenem na  $-70^\circ\text{C}$ . Kompetentne celice smo shranili pri  $-70^\circ\text{C}$ .

### 3.2.6 Priprava klonske knjižnice

PCR pomnožke smo z agarozno gelsko elektroforezo ločili, jih izrezali iz gela ter jih s kompletom za izolacijo in čiščenje nukleinskih kislin iz agaroznega gela (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN) očistili po navodilih proizvajalca. Za kloniranje očiščenih pomnožkov smo uporabili CloneJET™ PCR Cloning KIT (Fermentas MBI, Litva). Najprej smo zamešali 18  $\mu\text{l}$  encimske mešanice, ki je vsebovala 10  $\mu\text{l}$  2-kratnega reakcijskega pufra, 3  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{l}$ ) očiščenega PCR produkta, 4  $\mu\text{l}$  (2  $\mu\text{l}$ ) vode brez nukleaz in 1  $\mu\text{l}$  encima (DNA blunting enzyme). Po 5-minutni inkubaciji mešanice v vodni kopeli pri  $70^\circ\text{C}$  smo naredili ligacijsko mešanico, in sicer smo encimski mešanici dodali 1  $\mu\text{l}$  T4 DNK ligaze

(5 $\mu$ l) in 1  $\mu$ l pJET 1,2/*blunt cloning* vektorja. Suspenzijo smo inkubirali pri sobni T (23 °C) 30 minut. Sledila je transformacija z že prej pripravljenimi kompetentnimi celicami, ki so bile shranjene na -70 °C. 5  $\mu$ l ligacijske mešanice smo dodali 50  $\mu$ l kompetentnih celic in vse skupaj inkubirali na ledu 20 do 30 minut. Sledila je izpostavitev celic topotemu šoku, tako da smo suspenzijo 1 minuto inkubirali v vodni kopeli pri 42 °C in jo nato takoj prenesli na led. Suspenziji smo dodali 200  $\mu$ l tekočega gojišča LB, ki je bil predhodno segret na 37 °C in stresali 1 uro pri 37 °C pri frekvenci 175 stresljajev/min. Transformirane celice smo razmazali na LB trda gojišča z dodanim ampicilinom (1 $\mu$ g/ml) in jih pustili rasti čez noč pri 37 °C. Naslednji dan smo s sterilnimi zobotrebci precepili kolonije iz agarskih gojišč na mikrotitrskie plošče s tekočim LB *freezing* pufrom. Plošče smo nato inkubirali v stresalniku pri 37 °C pri frekvenci 60 stresljajev/min. Klone zrasle na mikrotitrskih ploščah smo po inkubaciji prenesli s t.i. 96 igličnim replikatorjem (priprava s 96 konicami za prenos klonov) na OmniTray agarske plošče z dodanim ampicilinom in jih shranili pri 4 °C.

### 3.2.7 Sekvenciranje in analiza sekvenč

OmniTray plošče s kloni smo poslali v podjetje Macrogen Inc. (Seul, Južna Koreja), kjer so po našem naročilu izvedli sekvenciranje s sekvencijskim začetnim oligonukleotidom T7 Promoter. Sekvence smo pregledali s programom Mega 4.0, ki je dostopen na spletni strani [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net). Najprej smo sekvenče pregledali s programom Orientation Cheker, ki je prosto dostopen na spletu (Ashelford, 2010a). Delo smo nadaljevali s programom Codon Aligner (CodonCode Corporation, 2010), ki je enako prosto dostopen na spletu. Z njim smo odstranili nezanesljive začetne in končne dele sekvenč ter začetne oligonukleotide, ki smo jih določili z medsebojno primerjavo sekvenč in kromatogrami, ki so prikazovali kvaliteto oziroma zanesljivost posameznega nukleotida. S programom Chimera\_Check 2.7 na spletni strani Ribosomal Database Project (Cole in sod., 2003) in programom Chimera check with Bellerophon (version 3) na spletni strani Greengenes (DeSantis in sod., 2006) smo poiskali in odstranili himerne sekvenče. Nadaljnjo obdelavo sekvenč smo izvedli z različnimi orodji programa Mega 4.0. Z algoritmom Clustal W (Tamura in sod., 2007) smo sekvenče poravnali in razdelili v posamezne skupine, glede na podobnost zaporedja nukleotidov. Evolucijske razdalje med sekvenčami smo izračunali s Kimurinim dvoparametričnim modelom. Filogenetska drevesa smo narisali z metodo združevanja sosedov (Saitou in Nei, 1987) in statistično ovrednotili z bootstrap metodo ponovnega vzorčenja pri 1000 ponovitvah.

### 3.2.8 Priprava začetnih oligonukleotidov

Večina začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali v reakcijah PCR je bilo povzetih po literaturi, le eden je bil pripravljen *in silico*. Sekvenče genov za 16S rRNK, ki smo jih dobili s kloniranjem, smo s programskega paketoma Mega 4.0 poravnali in ročno pregledali.

Pregledane sekvence, ki so glede na filogenetsko umestitev na spletni strani baze podatkov "Ribosomal Database Project II" (RDP II) (Cole in sod., 2003) pripadale družini *Peptostreptococcaceae*, smo nato prenesli v program Primrose (Ashelford in sod., 2002), s katerim smo poiskali možne začetne oligonukleotide. Specifičnost kandidatov smo preverili s prosto dostopnim programom OligoCheck (Ashelford, 2010b). Izmed potencialnih začetnih oligonukleotidov smo izbrali tistega, ki je imel največ specifičnih zadetkov glede na izbrano tarčno skupino in čim manj nespecifičnih zadetkov. Sekvence bakterij, ki so sestavljale tarčno skupino (sekvence bakterij iz družine *Peptostreptococcaceae*), smo pridobili na spletni strani baze podatkov RDP II. Na isti spletni strani smo izbrani začetni oligonukleotid dodatno preverili s prosto dostopnim programom "Probe match" (Cole in sod., 2005). Na spletni strani "Intergrated DNA Technologies" smo z orodjem OligoAnalyzer (Owczarzy in sod., 2008) izbrani začetni oligonukleotid analizirali in mu poiskali najbolj primeren par za izvedbo tehnike PCR.

### 3.2.9 FISH (Fluorescent *in situ* hybridization)

#### 3.2.9.1 Oligonukleotidne sonde

Pri delu smo uporabili tri oligonukleotidne sonde označene s fluorescentnim barvilmom cianin-3 (Cy3), ki so bile sintetizirane po naročilu v podjetju Microsynth (Balgach, Švica).

**Preglednica 4: Nukleotidne sekvence uporabljenih oligonukleotidnih sond.**

sonda	Specifičnost	Nukleotidna sekvencia (5'-3')	Fluorokrom	Vir
Eub 338	Univerzalna bakterijska	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Cy3	Amann in sod., 1990
Fd1	Univerzalna bakterijska	TGAGGCCAGGATCAAACCTCT	Cy3	Weisburg in sod., 1991
SimN	<i>P. incertae sedis</i>	ATCTTCCTTGAGGACAGAG	Cy3	To delo

#### 3.2.9.2 Fluorescentna *in situ* hibridizacija

Pri delu smo uporabili fekalne vzorce in vzorce vsebine prebavnega trakta močerila, ki so bili do uporabe shranjeni pri -20 °C. Najprej smo vzorce centrifugirali in odstranili supernatant. Sledilo je spiranje celic, kjer smo vzorce najprej resuspendirali v 1 ml PBS, pH 7,4, nato smo jih centrifugirali 5 minut pri 7000 × g ter na koncu odstranili supernatant. Spiranje smo ponovili 2-krat. Večje celice smo odstranili z 10-minutnim centrifugiranjem pri 200 × g. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in celice fiksirali v 3-kratnem volumnu 4 % paraformaldehida čez noč pri 4 °C. Celice v paraformaldehidu smo

sprali v ledeno hladnem pufru PBS, pH 7,4 (spirali smo pri 4 °C, in sicer 2-krat) in jih do uporabe shranili v mešanici pufra PBS in 96-odstotnega (vol. %) etanola (1:1) pri -20 °C. Fiksirane celice smo nanesli na predmetna stekelca z adhezijsko prevleko (Microscope slides SuperFrost®/Plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemčija) in jih posušili na zraku. Posušen preparat smo najprej 15 minut inkubirali v hibridizacijski pečici (Shaker SI 20H, Stuart scientific, Velika Britanija) pri 46 °C in nato dehidrirali v vrsti alkoholov z naraščajočimi koncentracijami: 3 minute v 50 % (vol. %), 3 minute v 80 % (vol. %) in 3 minute v 96 % (vol. %) etanolu. Preparat smo posušili na zraku in dodali 9 µl hibridizacijskega pufra (pufer je bil predhodno segret na 46 °C) in 1 µl (5ng/µl) s cy3 označene sonde. Sistem smo nepredušno zaprli s samolepilnimi komorami (Frame-Seal™ 25 µl, BIO-RAD, Hercules) in inkubirali 4 ure v hibridizacijski pečici pri 46 °C. Po končani hibridizaciji smo nevezano sondno sprali z 2 ml hibridizacijskega pufra (pufer je bil predhodno segret na 46 °C) in inkubirali predmetna stekelca 60 minut pri 46 °C z rahlim mešanjem (6 obratov/min) v hibridizacijski pečici. Po inkubaciji smo predmetna stekelca sprali z destilirano vodo (Milli-Q) in posušili na zraku v temi.

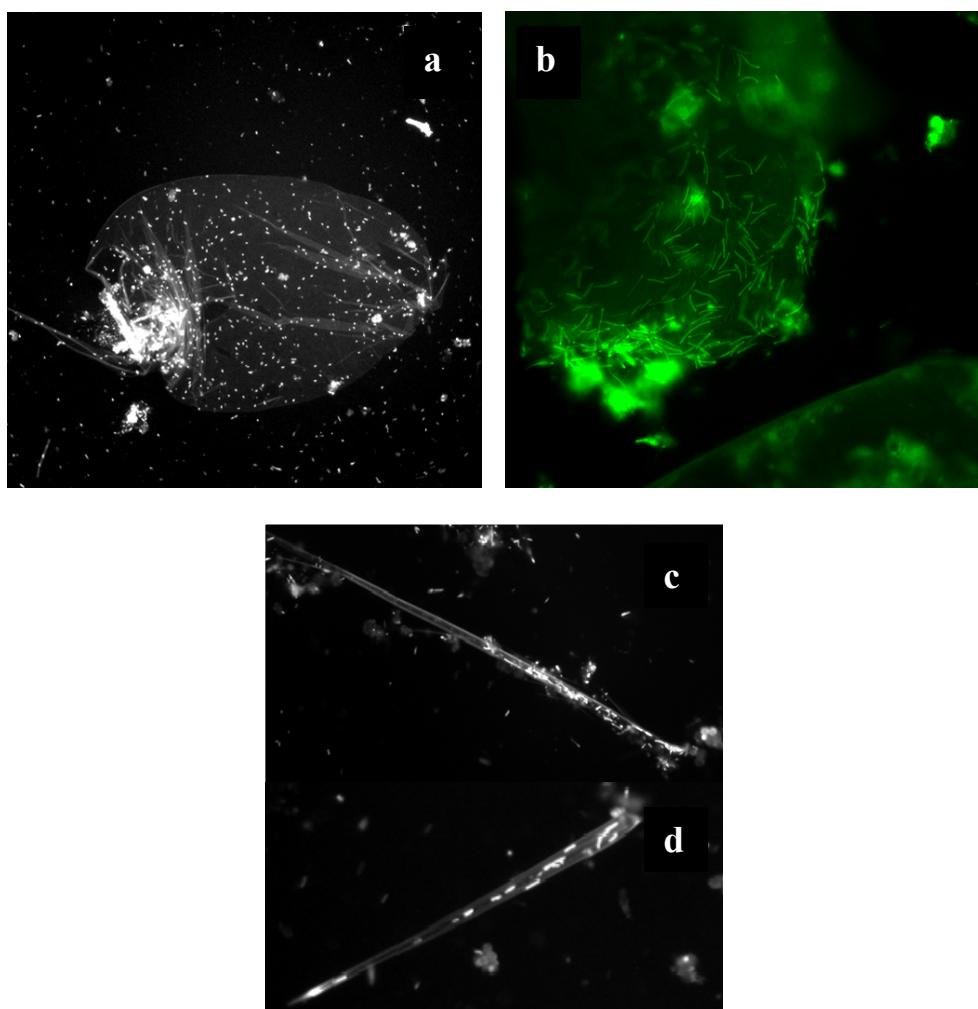
### **3.2.10 Epifluorescentna mikroskopija in mikrofotografija**

Vzorce prebavne vsebine prebavnega trakta močerila, fiksirane na običajna mikroskopska objektna stekelca smo barvali s fluorescentnimi barvili PI (propidijev jodid) (Sigma Aldrich, ZDA) in FITC (fluorescin izotiocianata) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Vzorec smo odtalili v majhni količini sterilne fiziološke raztopine mu dodali nekaj µl delovne raztopine PI. V primeru fluorescenčnega barvila FITC, smo le tega raztopili v acetonu. Koncentracija založne raztopine je bila 1mg/ml (Miller in Quarles, 1990). Pri mikroskopiranju smo uporabili delovno raztopino, ki smo jo primerno redčili v PBS, pH 7,4. Koncentracija delovne raztopine je bila 50 µg/ml. S FITC smo barvali objektna stekelca s fiksiranimi vzorci, na katerih je potekala hibridizacija. Vzorce fiksirane na objektna stekelca smo opazovali z epifluorescentnim mikroskopom BX50 (Olympus optical Co., Japonska) pri 400- in 1000-kratni povečavi. Uporabljali smo filtrske sisteme U-MWB, U-MSWB in U-MSWG. Prenos slike iz mikroskopa na osebni računalnik je omogočila digitalna kamera Hamamatsu Orca 1.

## 4 REZULTATI

### 4.1 MIKROSKOPSKA ANALIZA VSEBINE PREBAVNEGA TRAKTA MOČERILA

Vzorce prebavne vsebine močerila smo najprej mikroskopsko pregledali. Vzorce smo fiksirali na objektna stekelca in jih po barvanju s propidijevim jodidom (Slika 3) opazovali z epifluorescentnim mikroskopom BX50 pri različnih povečavah.



**Slika 3: Fluorescentna mikroskopija vzorca vsebine prebavnega traka močerila.** Vzorec je bil fiksiran na objektno stekelce in pobaran z barvilm propidijev jodid ter mikroskopsko pregledan pri a) 400-kratni povečavi oziroma b), c), d) 1000-kratni povečavi.

Pregled slik fluorescentne mikroskopije vzorca prebavne vsebine močerila je pokazal, da je večina bakterij v vzorcu paličaste oblike. Nekatere bakterije so bile vezane na ostanke hrane, med drugim na dobro prepoznavne okončine plena (Slika 3a, 3b, 3c in 3d), s katerim se je močeril prehranjeval. Kot smo pričakovali, je bilo po mikroskopski analizi

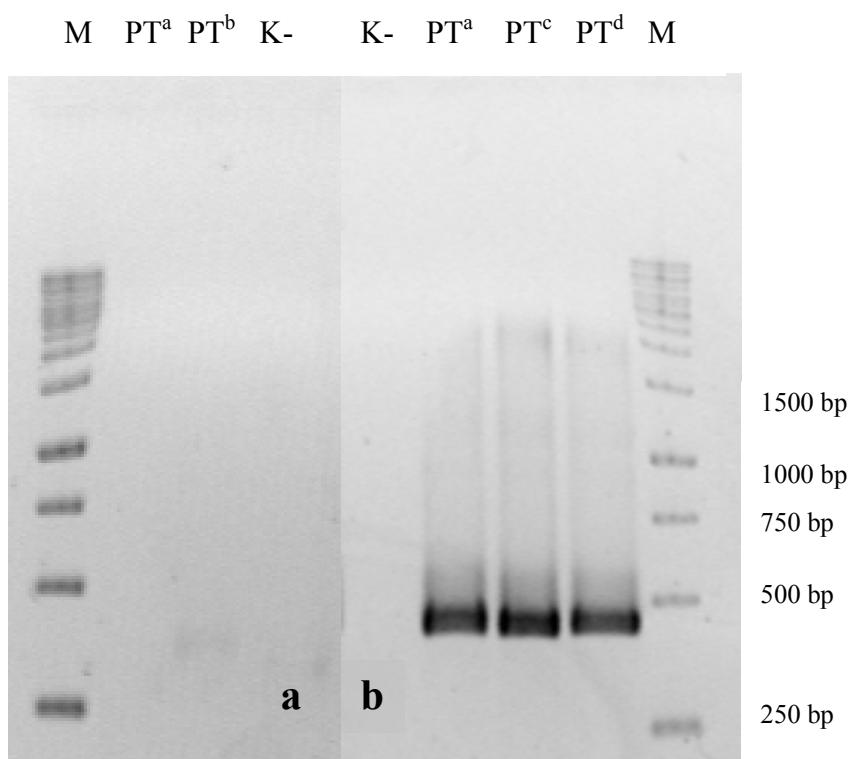
očitno, da so mikroorganizmi v vzorcu prebavne vsebine prisotni, medtem ko je bila morfološka pestrost prebavne mikrobiote močerila nepričakovano majhna.

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

V nadaljevanju smo iz vsebine prebavnega trakta in kasneje tudi fekalnih vzorcev izolirali skupno mikrobno DNK. Količino in kvaliteto DNK, ki smo jo izolirali iz vzorcev smo najprej analizirali z agarozno gelsko elektroforezo.

Na gelu nismo odkrili značilnih lis, ki bi potrjevale prisotnost mikrobne DNK, kar je bilo presenetljivo glede na to, da gre za vzorec vsebine prebavnega trakta. Res pa je, da smo izolirali mikrobno DNK iz zelo majhne količine vsebine prebavnega trakta. Zato je tudi nismo analizirali naprej z npr. spektrofotometrično analizo, temveč smo jo takoj uporabili kot matrico v verižni reakciji s polimerazo.

Bakterijske gene za 16S rRNK smo poskušali pomnožiti z verižno reakcijo s polimerazo z različnimi pari začetnih oligonukleotidov. Pri tem smo uporabili dve kombinacije začetnih oligonukleotidov, in sicer par F968-1401r ter par Fd1-1401r. S paroma začetnih oligonukleotidov Met86f-Met1340r in F357gc-691r smo ugotavljali prisotnost arhejske DNK (predvsem metanogenih arhej) v vzorcu. Na agaroznem gelu, na katerem smo ločevali produkte pomnoževanja arhejskih genov za 16S rRNK nismo odkrili značilnih lis (Slika 4a), ki bi potrjevale prisotnost arhejske DNK, za razliko od gela, na katerem smo preverjali rezultate pomnoževanja bakterijskih genov za 16S rRNK (Slika 4b).



**Slika 4: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR).** a) PCR z začetnima oligonukleotidoma F357gc-691r. M – velikostni standard 1kb 'GeneRuler<sup>TM</sup> 1kb DNA Ladder' (Fermentas), PT<sup>a</sup> (1 µl 2-krat redčene mikrobne DNK), PT<sup>b</sup> (1 µl 10-krat redčene mikrobne DNK), K- – negativna kontrola (brez DNK v reakciji PCR). b) PCR z začetnima oligonukleotidoma F968-1401r. K- – negativna kontrola (brez DNK v reakciji PCR), PT<sup>a</sup> (1 µl 2-krat redčene mikrobne DNK), PT<sup>c</sup> (1 µl mikrobne DNK), PT<sup>d</sup> (2 µl mikrobne DNK), M – velikostni standard 1kb 'GeneRuler<sup>TM</sup> 1kb DNA Ladder' (Fermentas).

#### 4.3 PRIPRAVA KLONSKIH KNJIŽNIC GENOV ZA 16S rRNK POMNOŽENIH Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

Očiščene PCR pomnožke, pridobljene z začetnima oligonukleotidoma Fd1 in 1401r, smo klonirali s kompletom za kloniranje PCR produktov CloneJET<sup>TM</sup>. Kloniranje vzorca vsebine prebavnega trakta močerila iz naravnega okolja smo izvedli v treh poskusih.

Zaradi majhne morfološke pestrosti bakterij opažene pri pregledovanju vzorcev pod epifluorescentnim mikroskopom, smo se iz previdnosti odločili najprej sekvencirati le del klonske knjižnice pripravljene iz skupne mikrobne DNK, ki smo jo izolirali iz vsebine prebavnega trakta močerila PT, t.j. 16 klonov. Sekvenciranje so izvedli v podjetju Macrogen Inc. (Seul, Južna Koreja), pri čemer so uporabili začetni oligonukleotid pJET1.2 forward.

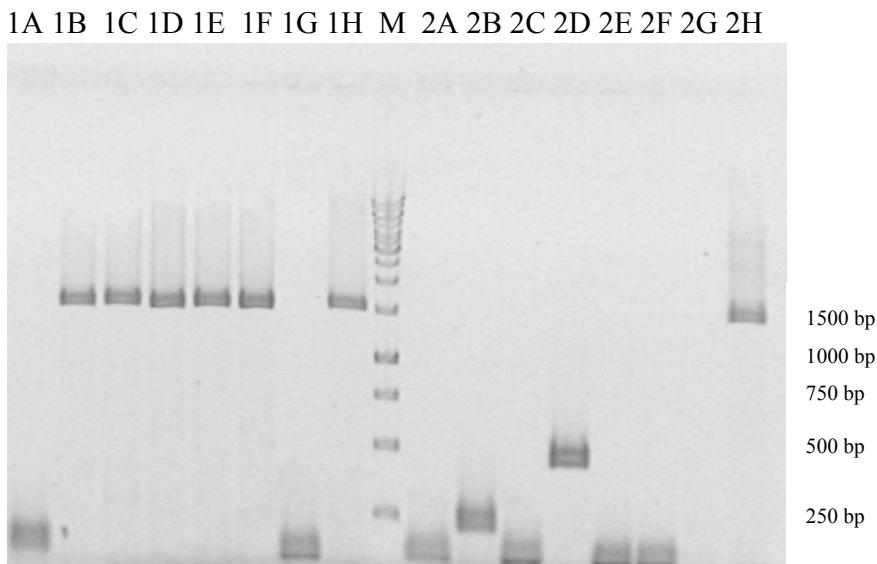
```

norank Root (8 sequences) [show assignment detail]
» » domain Bacteria (8)
» » » phylum Firmicutes (8)
» » » » class Clostridia (8)
» » » » » order Clostridiales (8)
» » » » » family Peptostreptococcaceae (5)
» » » » » » genus Clostridium XI (5)
» » » » » family Clostridiaceae 1 (3)
» » » » » » genus Clostridium sensu stricto (2)
» » » » » » unclassified_ Clostridiaceae 1 (1)

```

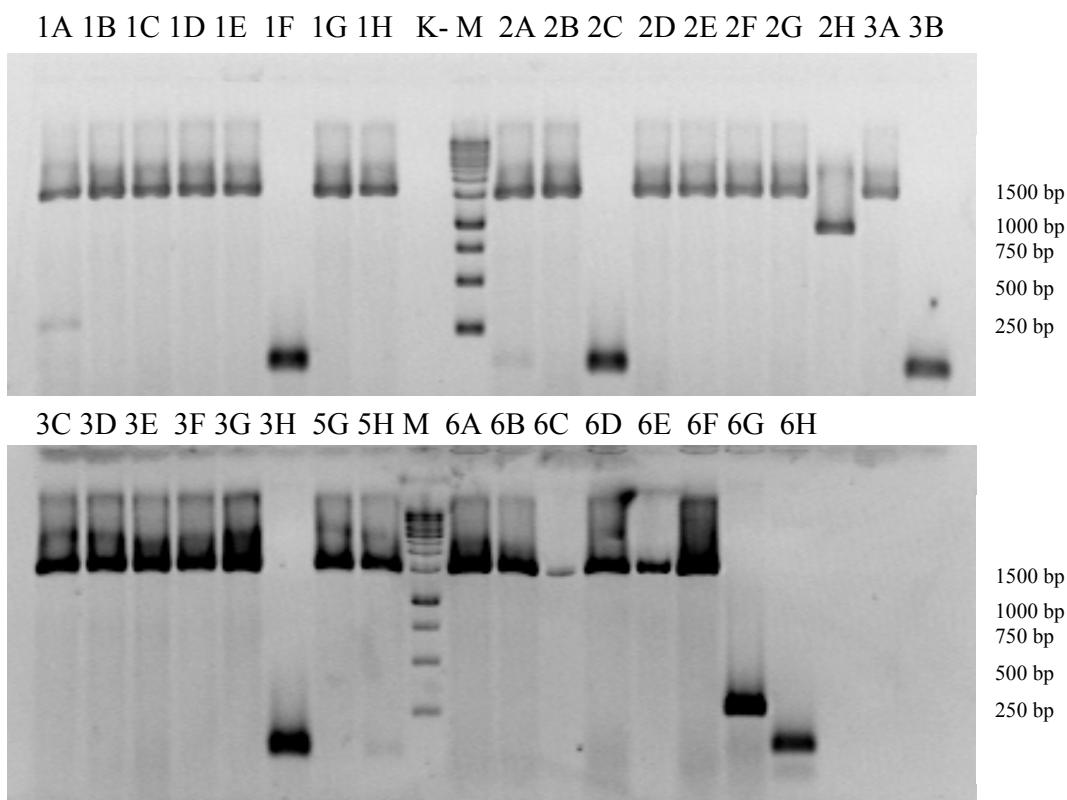
**Slika 5:** Rezultati taksonomske umestitve sekvenc genov za 16S rRNK v filogenetski bakterijski sistem z orodjem RDP Classifier (Cole in sod., 2005).

Filogenetsko umestitev pridobljenih sekvenc smo najprej preverili na spletni strani RDP II z orodjem RDP Classifier (Cole in sod., 2005)-. Ugotovili smo, da smo pridobili smiselne nukleotidne sekvence le iz sedmih klonov, ki jih je RDP Classifier vse uvrstil v deblo po Gramu pozitivnih bakterij *Firmicutes* in znotraj tega v red *Clostridiales*. Ker smo hoteli preveriti, zakaj nismo pridobili ustreznih sekvenc iz vseh 16 klonov, smo velikost kloniranih insertov preverili še z elektroforetsko analizo (Slika 6). Z analizo klonov z reakcijo PCR in agarozno gelsko elektroforezo smo ugotovili, da je bil insert pričakovane dolžine dejansko prisoten le pri osmih klonih, in sicer tistih, pri katerih je bilo uspešno tudi sekvenciranje.



**Slika 6:** Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse. Pomnoževali smo klonirane inserte iz klonske knjižnice pripravljene iz skupne mikrobne DNK izolirane iz vzorca vsebine prebavnega trakta močerila PT. Analizirali smo 16 klonov. M – velikostni standard 1kb 'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas), 1A, 1B,..., 2H – oznake klonov.

Zaradi majhnega deleža uspešno kloniranih sekvenc (50 %), smo pripravo knjižnice iz skupne mikrobne DNK izolirane iz vzorca vsebine prebavnega trakta močerila PT ponovili. Preden smo klone poslali sekvencirati, smo tokrat predhodno z agarozno gelsko elektroforezo preverili uspešnost kloniranja. Pri 34 analiziranih klonih smo v 80 % odkrili prisotnost inserta pričakovane dolžine (Slika 7).



**Slika 7: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse.** Pomnoževali smo klonirane inserte iz klonske knjižnice pripravljene iz skupne mikrobne DNK izolirane iz vzorca vsebine prebavnega trakta močerila PT.. Analizirali smo 34 naključno izbranih klonov iz pripravljene klonske knjižnice. M – velikostni standard 1kb 'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas), 1A, 1B,...,6H – oznake klonov, K- – negativna kontrola (brez DNK v reakciji PCR).

Ker so bile pri prvem kloniranju vse pridobljene sekvene homologne sekvencam bakterij iz enega samega redu (Slika 5), smo poslali na ponovno sekvenciranje le eno OmniTray ploščo s 96 kloni. Sekvenciranje je namreč drago in v primeru majhne pestrosti mikrobne združbe, ko npr. popolnoma prevladuje le ena skupina mikroorganizmov, sekvenciranje velikega števila klonov ni smiselno.

```

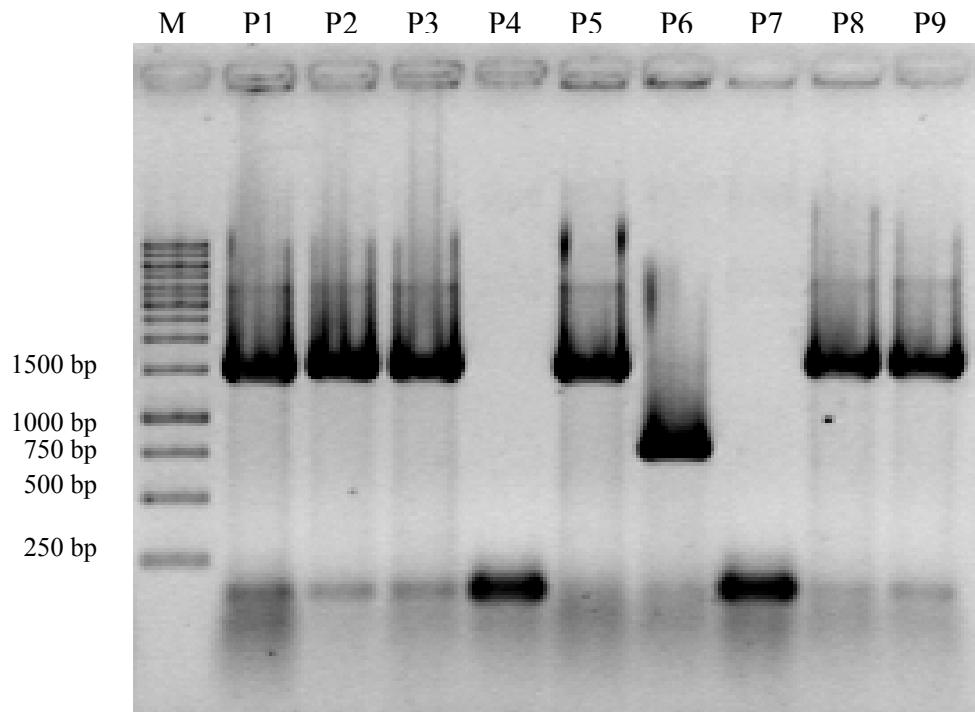
norank Root (82 sequences) [show assignment detail]
» » domain Bacteria (82)
» » » phylum "Fusobacteria" (1)
» » » » class "Fusobacteria" (1)
» » » » » order "Fusobacteriales" (1)
» » » » » » family "Fusobacteriaceae" (1)
» » » » » » » genus Cetobacterium (1)
» » » phylum "Proteobacteria" (1)
» » » » class Betaproteobacteria (1)
» » » » » order Burkholderiales (1)
» » » » » » family Comamonadaceae (1)
» » » » » » » genus Diaphorobacter (1)
» » » phylum Firmicutes (80)
» » » » class Erysipelotrichia (1)
» » » » » order Erysipelotrichales (1)
» » » » » » family Erysipelotrichaceae (1)
» » » » » » » genus Turicibacter (1)
» » » » class Clostridia (79)
» » » » » order Clostridiales (79)
» » » » » » family Clostridiaceae 1 (5)
» » » » » » » genus Clostridium sensu stricto (2)
» » » » » » » unclassified_Clostridiaceae 1 (3)
» » » » » » family Peptostreptococcaceae (72)
» » » » » » » genus Clostridium XI (67)
» » » » » » » unclassified_Peptostreptococcaceae (5)
» » » » » » » unclassified_Clostridiales (2)

```

**Slika 8: Rezultati taksonomske umestitve sekvenč genov za 16S rRNA v filogenetski bakterijski sistem z orodjem RDP Classifier (Cole in sod., 2005).**

Filogenetsko umestitev pridobljenih sekvenč smo tudi v tem primeru preverili na spletni strani RDP II z orodjem RDP Classifier. Ugotovili smo, da smo tokrat pridobili smiselne nukleotidne sekvenče iz 82 klonov (85,42 % uspešnost), od katerih jih je RDP Classifier 80 uvrstil v deblo *Firmicutes* in znotraj le tega v red *Clostridiales*. Od 80. klonov, se jih je kar 72 uvrstilo v družino *Peptostreptococcaceae*. Le dve sekvenči sta se uvrstili v druga debla, in sicer ena v deblo *Proteobacteria* in ena v deblo *Fusobacteria* (Slika 8).

V tretjem poskusu kloniranja bakterijskih pomnožkov genov za 16S rRNA smo uporabili skupno mikrobično DNK, ki smo jo izolirali iz fekalnega vzorca črnega močerila Č16. Preden smo klone poslali sekvencirati, smo uspešnost kloniranja preverili z reakcijo PCR in agarozno gelsko elektroforezo (Slika 9).



**Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov verižne reakcije s polimerazo (PCR) z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse.** Pomnoževali smo klonirane inserte iz klonske knjižnice pripravljene iz skupne mikrobne DNK izolirane iz vzorca vsebine prebavnega trakta močerila PT. Analizirali smo 9 naključno izbranih klonov. M – velikostni standard 1kb 'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas), P1, P2,..., P9 – oznake klonov.

Rezultati elektroforetske analize tretjega poskusa kloniranja (preverili smo približno 9 % klonov) so bili sicer slabši (66,67 %) od drugega poskusa, a smo se kljub temu odločili sekvencirati celotno OmniTray ploščo s 96 kloni. Rezultati sekvenciranja niso bili tako uspešni kot smo pričakovali. Pri analizi z agarozno gelsko elektroforezo se je izkazalo, da je bilo kloniranje uspešno le pri 20 klonih (20,83 %). Razlika v oceni uspešnosti kloniranja med elektroforetsko analizo pomnožkov plazmidne DNK in sekvenciranjem izbranih klonov je verjetno posledica več dejavnikov, med njimi naključja pri izbiri klonov in premajhnega števila izbranih klonov za kontrolno analizo.

```

norank Root (20 sequences) [show assignment detail]
  » » domain Bacteria (20)
    » » » phylum "Fusobacteria" (2)
      » » » » class "Fusobacteria" (2)
        » » » » » order "Fusobacteriales" (2)
          » » » » » » family "Fusobacteriaceae" (2)
            » » » » » » » genus Cetobacterium (1)
            » » » » » » » unclassified_ "Fusobacteriaceae" (1)
          » » » » phylum "Proteobacteria" (2)
            » » » » class Gammaproteobacteria (2)
              » » » » » order Aeromonadales (2)
                » » » » » » family Aeromonadaceae (2)
                  » » » » » » » genus Aeromonas (2)
              » » » » phylum "Bacteroidetes" (5)
                » » » » class "Bacteroidia" (5)
                  » » » » » order "Bacteroidales" (5)
                    » » » » » » family "Porphyromonadaceae" (5)
                      » » » » » » » genus Paludibacter (2)
                      » » » » » » » genus Parabacteroides (1)
                      » » » » » » » unclassified_ "Porphyromonadaceae" (2)
                » » » » phylum Firmicutes (11)
                  » » » » class Clostridia (11)
                    » » » » » order Clostridiales (11)
                      » » » » » » family Peptostreptococcaceae (1)
                        » » » » » » » genus Clostridium XI (1)
                      » » » » » » family Clostridiaceae 1 (8)
                        » » » » » » » genus Clostridium sensu stricto (7)
                        » » » » » » » unclassified_Clostridiaceae 1 (1)
                      » » » » » » family Lachnospiraceae (2)
                        » » » » » » » genus Cellulosilyticum (2)

```

**Slika 10:** Rezultati taksonomske umestitve sekvenc genov za 16S rRNK v filogenetski bakterijski sistem z orodjem RDP Clasifier (Cole in sod., 2005).

Po analizi pridobljenih sekvenc z orodjem RDP Classifier smo ugotovili, da smo tokrat pridobili smiselne nukleotidne sekvence le iz 20 klonov, od katerih jih je RDP Classifier 11 uvrstil v deblo *Firmicutes* in znotraj tega v red *Clostridiales*. Tokrat se je od 11 klonov le en uvrstil v družino *Peptostreptococcaceae*. Ostalih devet sekvenc se je uvrstilo v debla *Proteobacteria* (dve sekvenci), *Fusobacteria* (dve sekvenci) in *Bacteroidetes* (pet sekvenc).

Rezultati analize uspešnosti vseh treh kloniranj so zbrani v preglednici številka 5.

#### 4.4 FILOGENETSKA ANALIZA SEKVENC

Pripravili smo skupno podatkovno bazo iz vseh treh poskusov kloniranj, torej iz dveh knjižnic; vzorca prebavne vsebine nepigmentiranega močerila PT in fekalnega vzorca črnega močerila Č16. Rezultati so prikazani v obliki filogenetskega drevesa (Slika 11).

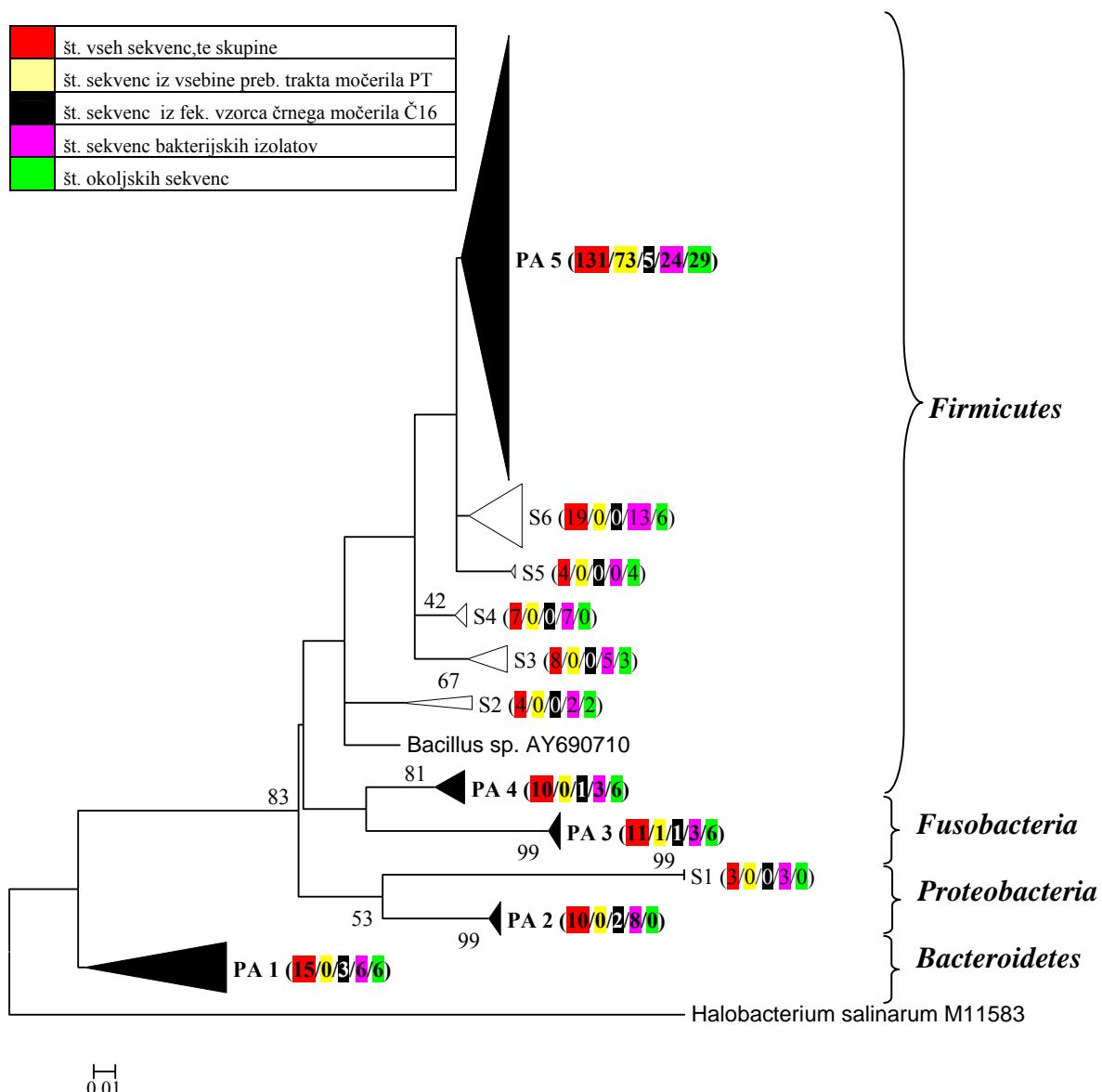
Preden smo naredili filogenetsko drevo, smo odstranili himerne sekvence, vektorske sekvence in sekvence z dvojnim šumom. Število uporabnih in neuporabnih (himerne,

vektorske) sekvenc je prikazano v preglednici številka 5. Uporabili smo filogenetsko analizo, ki temelji na poravnavi vseh sekven (Clustal multiple sequence alignment tool) in izračunom distančne matrike. Ker se sekvene s 3' konca (ki so bile usmerjene obratno, angl. *reverse*) s sekvenami s 5' konca niso prekrivale v dovolj velikem obsegu, z uporabljenim programom nismo uspeli izračunati distančne matrike in oblikovati filogenetskega drevesa, zato smo jih iz analize odstranili. Takšnih sekven je bilo 10. V obdelavo smo nato vključili še sekvene izbranih sorodnih tipskih sevov iz baze podatkov RDP II (sedem sekven). Program na Greengenovi spletni strani (DeSantis in sod., 2006), ki smo ga uporabili za filogenetsko analizo je v analizo samodejno vključil še po tri najbolj podobne nehimerne klonirane sekvene (62 sekven) ter tri najbolj podobne nehimerne sekvene izolatov (68 sekven) iz Greengenove baze podatkov.

**Preglednica 5: Število 16S rDNK sekven iz vsebine prebavnega trakta močerila in fecesa črnega močerila, ki smo jih pridobili v tej študiji.**

Poskus kloniranja 16S rDNK	Št. klonov, poslanih na sekvenciranje	Št. uporabnih sekven	Število neuporabnih sekven			
			Št. himernih sekven	Št. vektorskih sekven	Št. sekven z dvojnim šumom	Brez sekvene
P1	16	7 (43,75 %)	/	8 (50,00 %)	1 (6,25 %)	/
P2	96	73 (76,04 %)	4 (4,17 %)	12 (12,5 %)	3 (3,125 %)	2 (2,08 %)
P3	96	16 (16,67 %)	3 (3,125 %)	76 (79,17 %)	1 (1,04 %)	/

Zaradi velikega števila sekven in boljše preglednosti smo drevo prikazali v obliki, v kateri so večje monofiletske skupine sekven, med katerimi so tudi takšne, ki smo jih pridobili iz prebavnega trakta močerila, združene (črni trikotniki). Označili smo jih z oznako PA (*Proteus anguinus*) in zaporedno številko (pet skupin). Vsaki skupini smo pripisali število vseh sekven, ki so se uvrstile v to skupino, število sekven iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT, število sekven iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16, ter število sekven bakterijskih izolatov in število kloniranih okoljskih sekven. Skupine monofiletskih sekven, ki niso vsebovale sekven iz prebavnega trakta ali fecesa močerila, smo poimenovali S1 do S6 (skupina od ena do šest) oziroma PA 5.S1 do PA 5.S7 (podksupine znotraj skupine PA 5 od ena do sedem) (beli trikotniki) in v legendi (Slika 11) opisali, iz katerega okolja so bile izolirane oziroma kateremu bakterijskemu izolatu pripadajo.



**Slika 11: Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenč genov za 16S rRNK iz vzorca vsebine prebavnega trakta močerila PT in fekalnega vzorca črnega močerila Č16.** V analizo so vključene podobne sekvenče iz baz podatkov RDP II in Greengenes (Cole in sod., 2003; DeSantis in sod., 2006) z vpisnimi številkami. PA: monofiletske skupine sekvenč, med katerimi so tudi sekvenči iz prebavnega trakta močerila. Številke v oklepaju predstavljajo: št. vseh sekvenč, ki so se uvrstile v to skupino/št. sekvenč iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT/št. sekvenč iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16/št. sekvenč bakterijskih izolatov/št. okoljskih sekvenč. S1 – S6: skupine monofiletskih sekvenč, ki niso vsebovale sekvenč izoliranih iz vsebine prebavnega trakta ali fecesa močerila. Evolucijske razdalje smo izračunali s Kimurinim 2-parametričnim modelom. Drevo smo narisali z metodo Neighbor-Joining in statistično ovrednotili z metodo Bootstrap (1000 ponovitev). Merilo predstavlja število substitucij na nukleotidno mesto. Skupine brez sekvenč pridobljenih v tej študiji: S6 (13 bakterijskih sekvenč, ki pripadajo deblu *Firmicutes* (12 družini *Clostridiaceae* in ena družina *Clostridiales Family XI. In. sed.*) in so bile pridobljene iz fecesa in ustne votline človeka, vampa goveda in boerske koze; šest okoljskih

sekvenč pridobljenih iz kraškega izvira, vaginalnega epitelija ter fecesa žirafe, netopirja in opice (*Angola colobus*), S5 (štiri okoljske sekvenč pridobljene iz iz fecesa človeka, severnega medveda in ježa), S4 (sedem bakterijskih sekvenč, ki pripadajo deblu *Firmicutes* (štiri družini *Clostridiaceae* in tri družini *Peptostreptococcaceae*) in so bile pridobljene iz odpadne vode in prebavnega trakta prašiča), S3 (pet bakterijskih sekvenč, ki pripadajo družini *Peptostreptococcaceae* in so bile pridobljene iz anaerobnega digestorja, morskega sedimenta in hidrotermalne morske vode; tri okoljske sekvenč pridobljene iz prebavnega trakta človeka, prerijskih tal in zemlje "reed-bed" sistema), S2 (dve bakterijski sekvenči, ki pripadata deblu *Firmicutes* (ena družini *Erysipelotrichaceae* in ena družini *Bacillaceae*) in sta bili pridobljeni iz termalnega vrelca v Indiji in iz vzorca krvi človeka; dve okoljski sekvenči pridobljeni iz kraškega izvira in slepega črevesa miši), S1 (tri bakterijski sekvenče, ki pripadajo deblu *Betaproteobacteria*, družini *Comamonadaceae* in so bile pridobljene iz aktivnega blata).

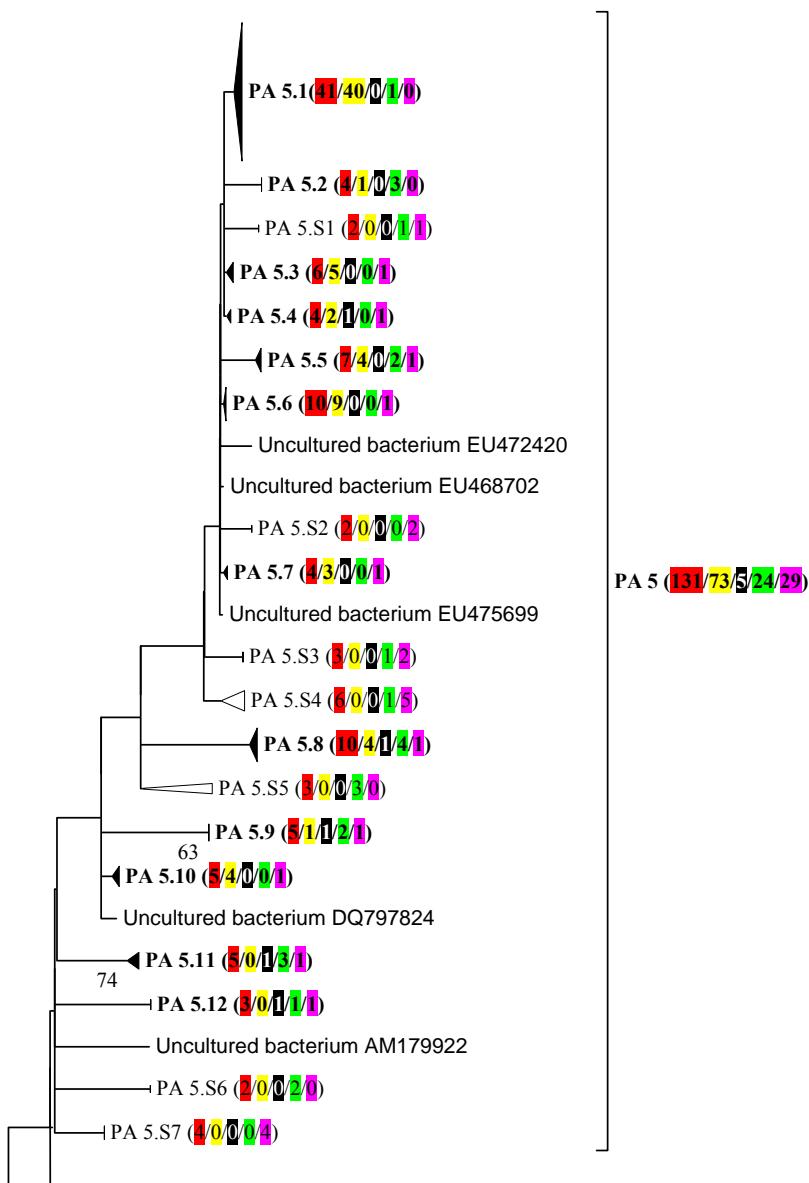
Večina pridobljenih sekvenč je homologna sekvenčam bakterij iz debla *Firmicutes*, tako kot je pokazala že analiza z orodjem RDP Classifier (10 sekvenč iz družine *Clostridiaceae* in 68 sekvenč iz družine *Peptostreptococcaceae*). V skupino sekvenč, ki so homologne sekvenčam bakterij iz družine *Clostridiaceae*, sodijo še tri sekvenče z obratnim zapisom, ki jih sicer v pripravo filogenetskega drevesa nismo vključili, so pa homologne sekvenčam iz te skupine. Med temi sta bili dve sekvenči pridobljeni iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj Č16* in ena iz prebavne vsebine nepigmentiranega močerila *P. anguinus PT*. V skupino sekvenč, ki so homologne sekvenčam bakterij iz družine *Peptostreptococcaceae* pa sodi še pet sekvenč z obratnim zapisom, ki so bile pridobljene iz vsebine prebavnega trakta nepigmentiranega močerila *PT*.

Kot smo že prej omenili, smo v filogenetsko analizo vključili tudi sekvenče izbranih sorodnih tipskih sevov iz baze podatkov RDP II (sedem sekvenč). Te so se uvrstili v monofiletske skupine sekvenč, ki niso vsebovale sekvenč izoliranih iz vsebine prebavnega trakta ali fecesa močerila, in sicer v skupino S6 (tri sekvenče; *Peptostreptococcus anaerobius* AY326462, *Peptostreptococcus stomatis* DQ160208, *Filifactor villosum* AF537211), S11 (tri sekvenče; *Tepidibacter formicigenes* AY245527, *Tepidibacter thalassius* AY158079, *Sporacetigenium mesophilum* AY682207) in PA 5.S1 (ena sekvenča; *Clostridium irregulare* X73447), katera pa je znotraj skupine PA 5 (Slika 12).

#### **4.4.1 Analiza filogenetske skupine PA 5 – firmikuti I.**

Večina pridobljenih sekvenč, ki se po analizi z orodjem RDP Classifier uvrščajo v družini *Clostridiaceae* in *Peptostreptococcaceae*, se je uvrstila v skupino PA 5 (Slika 12). Skupino smo zaradi boljše preglednosti razdelili na več podskupin z oznako PA 5.1 – PA 5.12 oziroma PA 5.S1 – PA 5.S7, kamor smo uvrstili sekvenče, ki niso bile pridobljene v tej študiji. Skupina PA 5 zajema 131 sekvenč in od tega jih je bilo 78 pridobljenih v tej študiji (73 sekvenč izoliranih iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus PT* in pet iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj Č16*). Večina sekvenč bakterijskih izolatov in

drugih okoljskih sekvenč v skupini je bilo pridobljenih iz fekalnih vzorcev sesalcev (Ley in sod., 2008). V skupino se, glede na analizo z orodjem RDP Classifier na spletni strani RDP II, uvršča še osem sekvenč (šest izoliranih iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT in dve iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj Č16*), ki pa jih zaradi obratnega zapisa (glej stran 31) nismo vključili v filogenetsko analizo.



**Slika 12: Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenč PA 5 in znotraj nje razvrstitev podskupin z oznako PA 5.1 – PA 5.12.** Številke v oklepaju predstavljajo: št. vseh sekvenč, ki so se uvrstile v to skupino/št. sekvenč iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT/št. sekvenč iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj Č16*/št. sekvenč bakterijskih izolatov/št. okoljskih sekvenč (glej legendo stran 32). PA 5.S1 – PA 5.S7: skupine monofiletskih sekvenč, ki niso vsebovale sekvenč izoliranih iz vsebine prebavnega trakta ali fecesa močerila. Monofiletske skupine brez sekvenč pridobljenih v tej študiji: PA 5.S1 (ena bakterijska sekvenca, ki pripada družini Peptostreptococcaceae; ena okoljska sekvenca pridobljena iz fecesa

človeka), PA 5.S2 (dve okoljski sekvenci pridobljeni iz fecesa severnega medveda), PA 5.S3 (ena bakterijska sekvenca, ki pripada družini *Peptostreptococcaceae*; dve okoljski sekvenci pridobljeni iz fecesa severnega medveda), PA 5.S4 (ena bakterijska sekvenca, ki pripada družini *Peptostreptococcaceae*; pet okoljskih sekvenčnih pridobljenih iz fecesa človeka in severnega medveda), PA 5.S5 (tri bakterijske sekvenčne, ki pripadajo družini *Clostridiaceae* in so bile pridobljene iz odpadne vode), PA 5.S6 (ena bakterijska sekvenca, ki pripada družini *Clostridiaceae*; ena okoljska sekvenca pridobljena iz vsebine prebavnega trakta postrvi), PA 5.S7 (štiri okoljske sekvenčne pridobljene iz fecesa severnega medveda in človeka ter vsebine tankega črevesa psa).

Sekvence iz baz podatkov, ki so se uvrstile v skupino PA 5, so bile pridobljene predvsem iz fekalnih vzorcev sesalcev (divji prašič Babirusa, severni medved, jež, netopir, žirafa, človek, opica *Angola colobus*, okapi) in tudi vsebine prebavnega trakta nekaterih rib (postrvi in navadne cebrice).

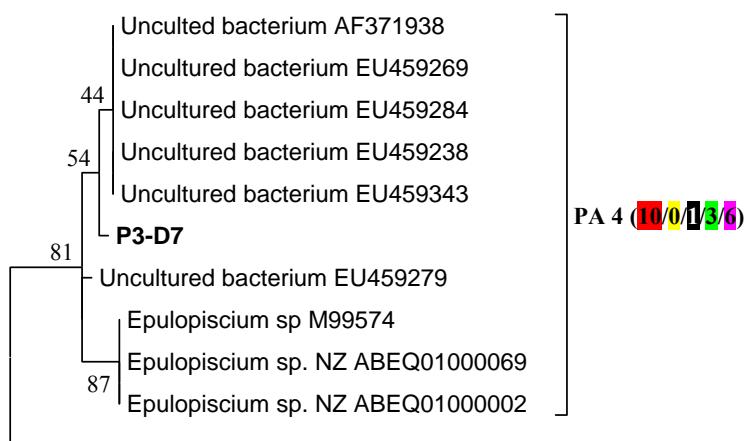
- Največja podskupina z oznako **PA 5.1** zajema 40 sekvenčnih izoliranih iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT. V to podskupino se je uvrstila še sekvenca sporogene bakterije *Clostridium ruminantium* (sev LA1), ki so jo pridobili iz živalskega kadavra in je sodeč po opisu psihrofilna.
- Ena sekvenca iz vsebine prebavnega trakta, se je uvrstila v podskupino **PA 5.2**, v katero so se uvrstile še tri sekvenčne pridobljene iz vzorcev različnih bioloških čistilnih naprav (Bagge in sod., 2010; Kaksonen in sod., 2004).
- Podskupina **PA 5.3** zajema šest sekvenčnih, od katerih je bilo pet pridobljenih v tej študiji in so bile izolirane iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT. Sekvencam je homologna le ena okoljska sekvenca, ki so jo pridobili iz vzorca prahu s tal (Taubel in sod., 2009).
- V podskupino **PA 5.5** se je uvrstilo sedem sekvenčnih, štiri pridobljene iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT, dve sekvenčni izolatovi iz vrst *Clostridium metallolevans* (sev SN1) in *Clostridium glycolicum* (sev SN12), ki so ju pridobili iz čistilne naprave ter okoljska sekvenca iz fecesa žirafe (Ley in sod., 2008).
- Druga največja podskupina v skupini PA 5 je podskupina z oznako **PA 5.6**, ki zajema devet sekvenčnih izoliranih iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT. V podskupino so vključene še homologne sekvenčne, ki so bile pridobljene iz fecesa divjega prašiča Babirusa (Ley in sod., 2008).
- Okoljska sekvenca iz fecesa divjega prašiča Babirusa se je uvrstila tudi v podskupino **PA 5.7**, v katero so vključene še tri sekvenčne iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT.
- Okoljska sekvenca iz fecesa žirafe se je uvrstila v podskupino **PA 5.10**, ki zajema še štiri sekvenčne izolirane iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT.

Sekvenčni, ki smo jih pridobili iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16, je v skupini z oznako PA 5 le pet (poleg teh pa sodita zraven še dve sekvenčni, ki jih zaradi obratnega zapisa nismo vključili v filogenetsko analizo).

- Okoljska sekvenca pridobljena iz fecesa živega fosila okapija (Ley in sod, 2008) je homologna trem sekvencam te študije (dve izolirane iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT in ena iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16), ki so se vse uvrstile v podskupino **PA 5.4**.
- Ena sekvenca izolirana iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16 se je uvrstila v podskupino **PA 5.8**, kjer so poleg te sekvene še štiri sekvene pridobljene iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT. Homologne sekvene iz baz podatkov, ki so se tudi uvrstile v to podskupino so bile pridobljene iz fecesa ježa (Ley in sod., 2008) in človeške kože (kožnega abscesa) (Drancourt in sod., 2000). V to podskupino se je uvrstila še sekvenca bakterije *Clostridium paraputreficum*, ki so jo raziskovalci pridobili iz vsebine predželodca vzhodnega sivega kenguruja *Macropus giganteus* (Ouwerkerk in sod., 2005).
- Podskupini PA 5.1 je podobna podskupina **PA 5.9**, v katero sta se uvrstili dve sekvenci prav tako psihrofilnih bakterij, v tem primeru iz vrste *Clostridium gasigenes* (sev DSM 1227 in sev R26), ki sta bila izolirani kot bakterijska kvarljivca vakuumsko pakiranega mesa (Broda in sod., 2000). V to podskupino sta se uvrstili še dve sekvenci iz naše študije, in sicer ena iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT in ena iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16.
- V podskupino **PA 5.11** se je uvrstilo pet sekvenc, med katerimi je bila ena izolirana iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16. Ostale štiri sekvence so bile pridobljene iz UASB reaktorja, sedimenta v mlaki (Sallam in Steinbuchel, 2009) in sedimenta rečnega izliva (Lin in sod., 2007).
- Ena sekvenca iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16 se je uvrstila v podskupino z oznako **PA 5.12**, ki zajema še dve sekvenci. Prva je bila pridobljena iz vsebine prebavnega trakta ribe (navadna cebrica, *Danio rerio*) in druga iz vzorca prsti, v kateri so raziskovalci odkrili bakterijo *Clostridium paraputreficum* (sev M21), ki je hitinolitičen in mezofilten striktni anaerob (Evvyernie in sod., 2000).

#### 4.4.2 Analiza filogenetske skupine PA 4 – firmikuti II.

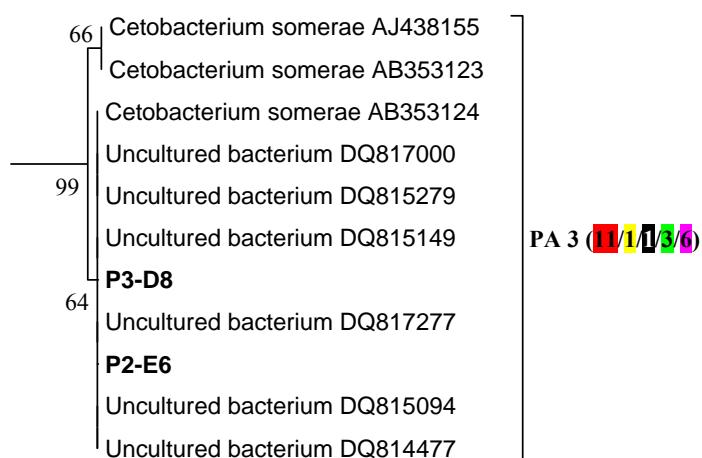
Ena sekvenca (P3-D7) iz iztrebka črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16, ki jo je RDP Classifier uvrstil v firmikutsko družino *Lachnospiraceae*, se je uvrstila v skupino, ki smo jo poimenovali PA 4 (Slika 13). V to skupino so se uvrstile tudi sekvene gigantske bakterije *Epulopiscium fishelsoni*, ki so jo odkrili v prebavnem traktu tropске koralne ribe *Acanthurus nigrofucus* (Clements in Bullivant, 1991; Angert in sod., 1993). V skupino PA 4 se je uvrstilo še pet sekvenč bakterij, ki so jih pridobili iz fecesa ježa (vse sekvene s predpono EU; Ley in sod., 2008) in ena sekvenca bakterije, ki so jo pridobili iz vsebine prebavnega trakta prašiča (sekvenca s predpono AF; Leser in sod., 2002). V to skupino sodi tudi še ena sekvenca pridobljena iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16, ki pa je zaradi obratnega zapisa (reverse) nismo vključili v samo filogenetsko analizo.



**Slika 13:** Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 4. Številke v oklepaju predstavljajo: št. vseh sekvenc, ki so se uvrstile v to skupino/št. sekvenc iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT/št. sekvenc iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj Č16*/št. sekvenc bakterijskih izolatov/št. okoljskih sekvenc (glej legendo stran 32). Oznake sekvenc: P – sekvence iz te študije (Proteus); 1, 2, 3, - klonska knjižnica iz 1., 2. ali 3. poskusa; A1, A2..., H12 – oznaka klonov.

#### 4.4.3 Analiza filogenetske skupine PA 3 - fusobakterije

Dve sekvenci (ena izolirana iz prebavnega trakta močerila *P. anguinus* PT in druga iz feca črnega močerila *P. anguinus parkelj Č16*) sta se uvrstili v skupino PA 3, ki združuje homologne sekvence iz debla *Fusobacteria*, in sicer šest okoljskih sekvenc bakterij, ki so jih pridobili iz prebavnega trakta sladkovodne rive navadna cevrica (*Danio rerio*) in iz prebavnega trakta miši, katerih prebavni trakt so kolonizirali z mikrobioto prebavnega trakta omenjene rive (Rawls in sod., 2006). V skupino so se uvrstile še sekvence bakterij *Cetobacterium somerae*, ki so jih pridobili iz prebavnega trakta zlate ribice (*Carassius auratus*) (sekvenci s predpono AB) in iz feca človeka (Finegold in sod., 2003).

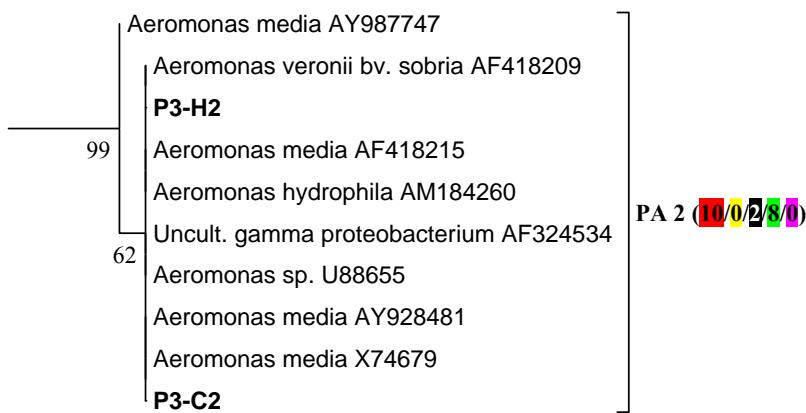


**Slika 14:** Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 3. Številke v oklepaju predstavljajo: št. vseh sekvenc, ki so se uvrstile v to skupino/št. sekvenc iz vsebine prebavnega

trakta močerila *P. anguinus parkelj* PT/št. sekvenc iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16/št. sekvenc bakterijskih izolatov/št. okoljskih sekvenc (glej legendo stran 32). Oznake sekvenc: P – sekvence iz te študije (Proteus); 1, 2, 3, - klonska knjižnica iz 1., 2. ali 3. poskusa; A1, A2..., H12 – oznaka klonov.

#### 4.4.4 Analiza filogenetske skupine PA 2 – $\gamma$ -proteobakterije

Skupino PA 2 sestavlja dve sekvenci izolirani iz fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16 in homologne sekvence bakterij iz razreda *Gammaproteobacteria*, družine *Aeromonadaceae*. V skupino so se uvrstile bakterijske sekvence iz vrst *Aeromonas media*, katere sevi so bili največkrat izolirani iz ribnikov in drugih vodnih virov, *Aeromonas veronii biovar sobria*, ki je največkrat povezana z boleznimi prebavnega trakta in *Aeromonas hydrophila*, ki jo raziskovalci ponavadi izolirajo iz morske in sladke vode, različnih morskih in sladkovodnih živali ter v vzorcev bolnikov s prebavnimi boleznimi (Martin-Carnahan in W. Joseph, 2005). Sekvence bakterij iz rodu *Aeromonas*, ki so se uvrstile v to skupino, so bile pridobljene iz rečne vode (Abraham in sod., 2007) in kanalizacijskih odplak (Sander in Schmieger, 2001).

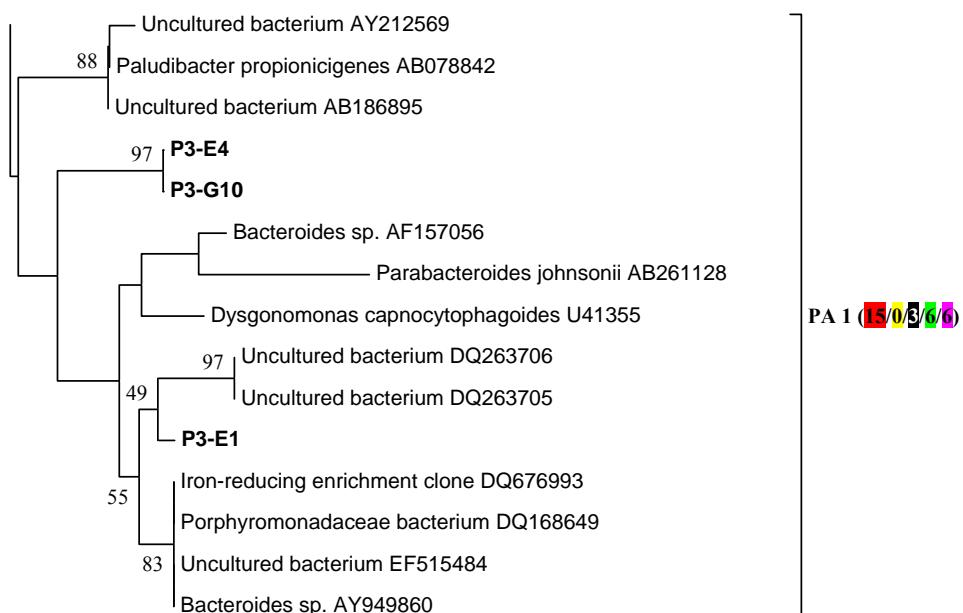


**Slika 15: Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 2.** Številke v oklepaju predstavljajo: št. vseh sekvenc, ki so se uvrstile v to skupino/št. sekvenc iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus parkelj* PT/št. sekvenc bakterijskih izolatov/št. okoljskih sekvenc (glej legendo stran 32). Oznake sekvenc: P – sekvence iz te študije (Proteus); 1, 2, 3, - klonska knjižnica iz 1., 2. ali 3. poskusa; A1, A2... H12 – oznaka klonov.

#### 4.4.5 Analiza filogenetske skupine PA 1 - bakteroidete

Vse tri sekvence, ki so homologne sekvencam bakterij iz debla *Bacteroidetes*, so na filogenetskem drevesu v skupini PA 1 (Slika 16). Izolati, ki so se uvrstili v to skupino, so pripadniki družin *Porphyromonadaceae* in *Bacteroidaceae* in so bili pridobljeni iz fecesa človeka (Sakamoto in sod., 2007), kožnega abscesa (Vandamme in sod., 1996), rastlinskih

ostankov na riževem polju (Akasaka in sod., 2003), iz odpadne kanalizacijske vode (Simpson in sod., 2004) in blata v bioreaktorju. Sekvenci z oznako P3-E1 sta najbliže sekvenci, ki so jih pridobili iz epidermalne sluzi atlantske polenovke *Gadus morhua* (Wilson in sod., 2008). Ostale okoljske sekvence te skupine so bile pridobljene iz sedimenta onesnažene reke na Japonskem (Yoshida in sod., 2005), konjskega gnoja (Simpson in sod., 2004), sedimenta onesnaženega rečnega izliva (Lin in sod. 2007) in blata bioreaktorja za obdelavo odpadkov pivovarne. V to skupino se je uvrstila tudi sekvencia izolirana iz vzorca fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16, ki je zaradi obratnega zapisa (reverse) nismo vključili v filogenetsko analizo.



**Slika 16: Del filogenetskega drevesa, ki je prikazano na sliki 12, in sicer skupina sekvenc PA 1.** Številke v oklepaju predstavljajo: št. vseh sekvenc, ki so se uvrstile v to skupino/št. sekvenc iz vsebine prebavnega trakta močerila *P. anguinus parkelj* PT/št. sekvenc iz fekalnega vzorca črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16/št. sekvenc bakterijskih izolatov/št. okoljskih sekvenc (glej legendo stran 32). Oznake sekvenc: P – sekvence iz te študije (Proteus); 1, 2, 3, - klonska knjižnica iz 1., 2. ali 3. poskusa; A1, A2... H12 – oznaka klonov.

#### 4.5 PRIPRAVA IN ANALIZA SPECIFIČNOSTI ZAČETNEGA OLIGONUKLEOTIDA SimN

Da bi preverili rezultate kloniranja in sekvenciranja in se prepričali, da so bakterije, katerih sekvence smo odkrili, dejansko v vzorcih prebavnega trakta močerila, smo se odločili uporabiti tehniko fluorescentne *in situ* hibridizacije ali na kratko FISH. Za izpeljavo smo potrebovali oligonukleotidne sonde, ki se morajo specifično vezati na komplementarne nukleotidne sekvence tarčnih bakterijskih celic. Potrebovali smo sondu, ki prepozna vse, oziroma večino bakterijskih celic ter drugo sondu, ki se specifično veže le na določeno skupino bakterij. Ker smo pri kloniranju ugotovili, da je večina bakterijskih sekvenc

homologna sekvencam bakterij iz debla *Firmicutes* in družine *Peptostreptococcaceae*, smo se odločili, da bomo poskusili pripraviti sondo, specifično prav za to skupino. Ker sonda, ki bi se specifično vezala na bakterije iz družine *Peptostreptococcaceae*, še ni poznana, smo jo pripravili sami. Sekvence, ki smo jih pridobili s kloniranjem smo razdelili v skupine glede na podobnosti in razlike nukleotidnih sekvenc. S programom Primrose smo odkrili 16 možnih specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki so bili primerni za sintezo sond (Priloga 1). Analizo specifičnosti sond smo izvedli na spletni strani baze podatkov "Ribosomal Database Project II" z orodjem "Probe match". Začetni oligonukleotid, ki je omogočal specifično odkrivanje največjega števila bakterij iz družine *Peptostreptococcaceae* in najmanjšega števila bakterij iz drugih taksonomskih skupin, je bil začetni oligonukleotid SimN, ki so ga po naših navodilih sintetizirali v podjetju Microsynth (Balgach, Švica). V preglednici številka 6 so podani rezultati analize specifičnosti začetnega oligonukleotida SimN.

Podatki v preglednici številka 6 veljajo za dan 14/09/2011. V iskanje smo vključili vse v RDP II bazo shranjene sekvence, t.j. 1613063 sekvenc. Tarčne sekvence so bile klonirane okolske sekvence in sekvence tipskih in netipskih izolatov družine *Peptostreptococcaceae* (v skupini je bilo 5742 sekvenc).

**Preglednica 6: Lastnosti začetnega oligonukleotida SimN (14/09/2011).**

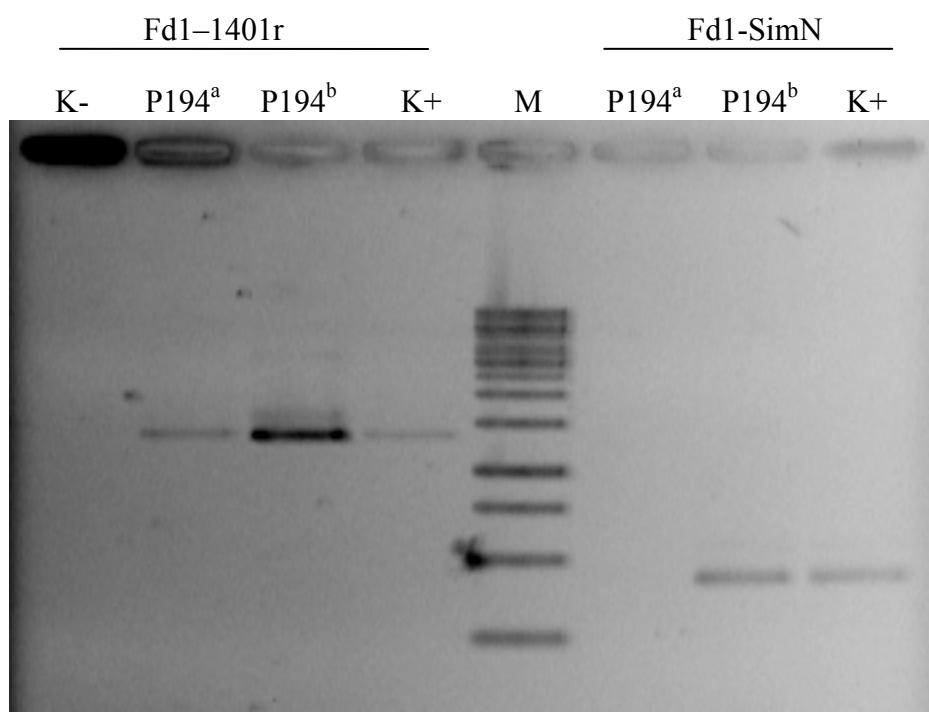
Sekvenca začetnega oligonukleotida (5'-3')	ATCTTCCTTGAGGACAGAG	
Dolžina začetnega oligonukleotida	19	
% GC baznih parov	47,4	
Zadetki brez napake	Vsi zadetki	4605
	<sup>a</sup> Specifični zadetki (%)	4240 (92,07 %)
	<sup>b</sup> Nespecifični zadetki (%)	365 (7,93 %)
Zadetki z eno dovoljeno napako	Vsi zadetki	4916
	<sup>a</sup> Specifični zadetki (%)	4431 (90,13 %)
	<sup>b</sup> Nespecifični zadetki (%)	485 (9,87 %)
Zadetki z dvema dovoljenima napakama	Vsi zadetki	5670
	<sup>a</sup> Specifični zadetki (%)	4496 (79,29 %)
	<sup>b</sup> Nespecifični zadetki (%)	1174 (20,71 %)

<sup>a</sup> klonirane okolske sekvence in sekvence tipskih in netipskih izolatov družine *Peptostreptococcaceae*

<sup>b</sup> klonirane okolske sekvence in sekvence tipskih in netipskih izolatov, ki ne sodijo v družino *Peptostreptococcaceae*

#### 4.5.1 Primerjava verižne reakcije s polimerazo z različnimi kombinacijami začetnih oligonukleotidov kot prikaz uporabnosti oligonukleotidne sonde SimN

Uporabnost sonde, ki so jo sintetizirali po naročilu v podjetju Microsynth, smo najprej preverili s pomnoževanjem bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR). Uporabili smo dve kombinaciji začetnih oligonukleotidov, in sicer Fd1-1401r (kontrola) ter SimN-1401r.



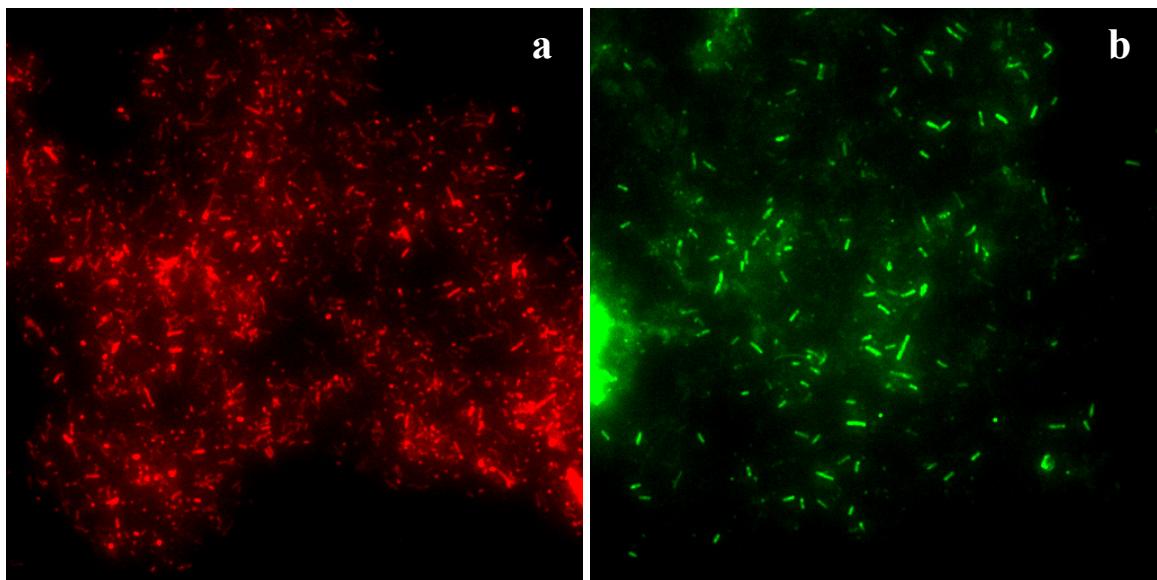
**Slika 17:** 1 % agarozni gel s PCR pomnoženimi deli genov za 16S rRNK s parom začetnih oligonukleotidov Fd1-1401r (kontrola) ter SimN-1401r. K- – negativna kontrola (brez DNK v reakciji PCR), K+ – pozitivna kontrola (DNK klona *P. anguinu*s PT<sub>28/10/08</sub> ali *P. anguinu*s Č16<sub>26/06/09</sub>), a – DNK fekalnega vzorca *P. anguinu*s P194<sub>03/11/08</sub>, b – DNK fekalnega vzorca *P. anguinu*s P194<sub>11/06/09</sub>, M – velikostni standard 1kb 'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas).

P194<sup>b</sup> je vzorec DNK, ki smo jo izolirali iz fecesa močerila *P. anguinu*s P194 (feces odvzet dne 11/06/09) in ga pomnožili v reakciji PCR s parom začetnih oligonukleotidov Fd1-1401r (kontrola) oziroma SimN-1401r (Slika 18). Na agaroznem gelu smo v obeh primerih odkrili lise ustrezno velikih pomnožkov reakcije PCR. P194<sup>a</sup> je vzorec DNK, ki smo jo izolirali iz fecesa močerila P194 (feces odvzet dne 03/11/08) in ga pomnožili na enak način. V tem primeru so bile lise ustrezno velikih pomnožkov prisotne le pri kontroli, kar pomeni, da v tem vzorcu ni bilo prisotnih bakterij, katerih DNK bi lahko pomnožili z začetnim oligonukleotidom SimN.

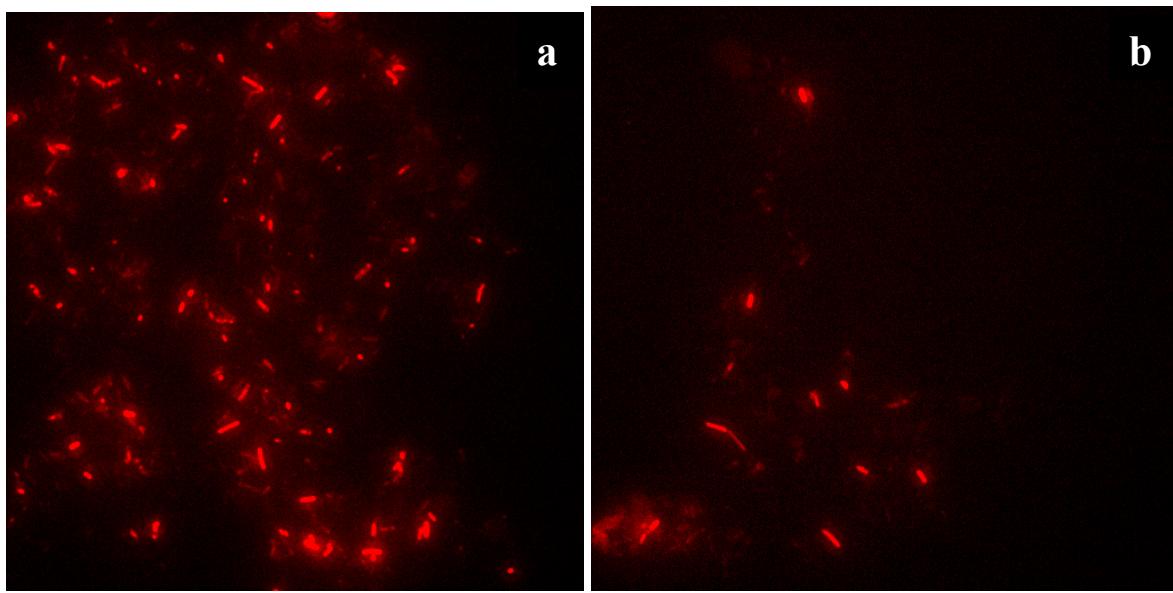
#### 4.6 FLUORESCENTNA *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Fekalne vzorce močerilov smo nato analizirali s tehniko fluorescentne *in situ* hibridizacije. Predmetna stekelca z vzorci smo po končani *in situ* hibridizaciji opazovali z epifluorescentnim mikroskopom, kjer smo odkrivali fluorescentni signal ustrezne oligonukleotidne sonde označene z barvilo Cy3.

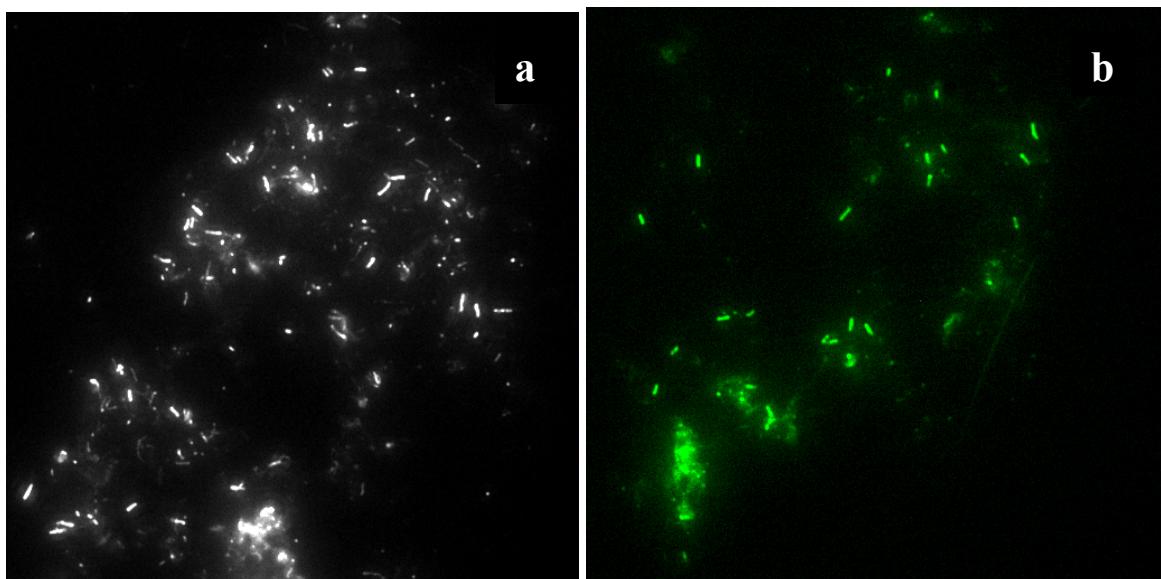
Slika, ki jo zazna CCD kamera na epifluorescentnem mikroskopu, ki smo ga uporabljali v okviru našega dela, je črna bela. Z računalniškim programom lahko sliko preparata modificiramo z različnimi barvnimi filtri. Ker smo iste preparate opazovali v različnih obdobjih in pri tem nismo bili dosledni pri izbiri uporabljenih programskega barvnih filtrov, je fluorescentni signal na slikah preparatov prikazan v različnih barvah, čeprav je bilo na vseh uporabljenih sondah vezano barvilo Cy3, ki oddaja rumeno zeleno svetlobo (emisijski maksimum pri 550 nm).



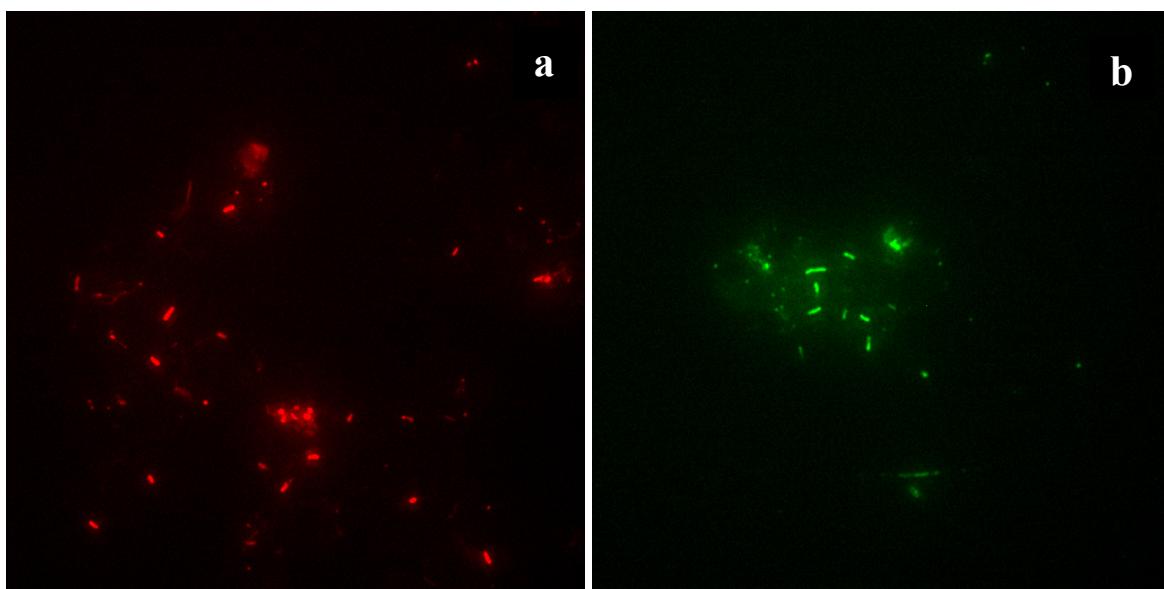
Slika 18: Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca *P. anguinus parkelj Č1626/8/09* obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi. a) FISH s sondom Fd1-Cy3, b) FISH s sondom SimN-Cy3.



Slika 19: Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca *P. anguinus* P194<sub>11/06/09</sub> obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi. a) FISH s sondom Fd1-Cy3, b) FISH s sondom SimN-Cy3.



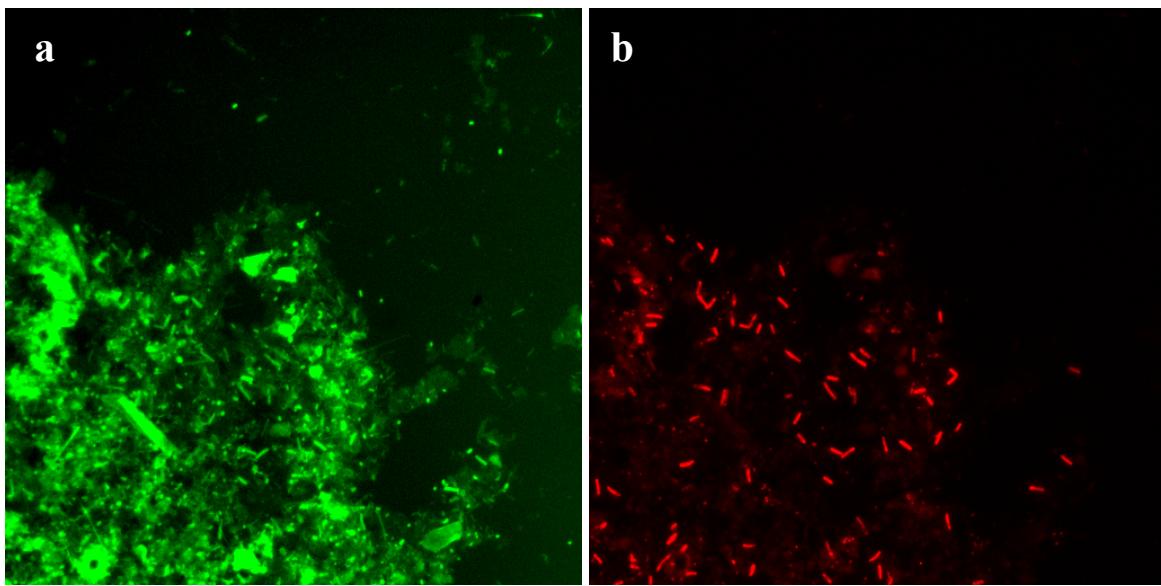
Slika 20: Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca *P. anguinus* P194<sub>27/7/09</sub> obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi. a) FISH s sondom Eub338-Cy3, b) FISH s sondom SimN-Cy3.



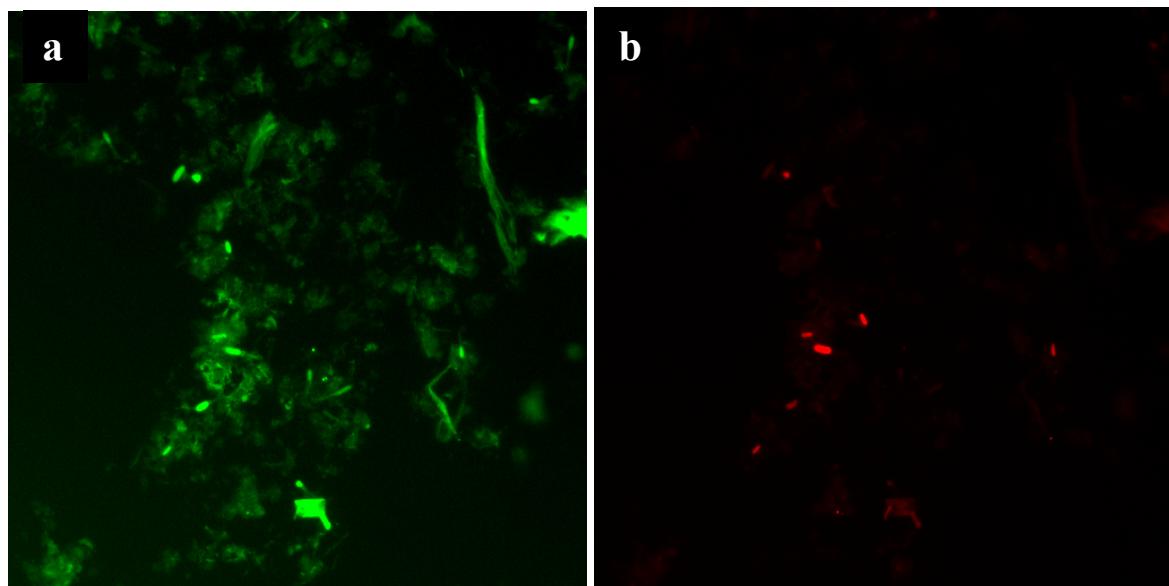
**Slika 21: Slika epifluorescentne mikroskopije vzorca vsebine zadnjega dela prebavnega trakta *P. anguinu*s PT<sub>28/10/08</sub> obdelanega s FISH pri 400-kratni povečavi. a) FISH s sondom Fd1-Cy3, b) FISH s sondom SimN-Cy3.**

Rezultati epifluorescentnega mikroskopiranja so fotografije (Slika 18 – 21), iz katerih je razvidno, da so bile v vseh vzorcih prebavne vsebine in fecesa močerila prisotne bakterije. S fluorescentno *in situ* hibridizacijo in uporabo sonde SimN-Cy3 smo v vseh vzorcih pokazali tudi prisotnost bakterij iz družine *Peptostreptococcaceae*. Nismo pa uspeli pokazati, kakšen je dejanski delež bakterij iz družin *Peptostreptococcaceae* v mikrobi združbi prebavnega trakta močerila. Pri delu smo namreč uporabili različne sonde, ki so bile vse označene z enakim fluorescentnim barvilm Cy3. Prednost uporabe barvila Cy3 je, glede na ostala fluorescentna barvila, počasnejše bledenje. Slabost uporabe enakega fluorescentnega barvila za vse oligonukleotidne sonde pa je, da smo lahko izvedli hibridizacijo posameznega vzorca z le eno sondou naenkrat. Ker smo na preparatu lahko tako opazovali fluorescentni signal le ene sonde, nismo uspeli kvantitativno oceniti deleža bakterij iz družine *Peptostreptococcaceae*.

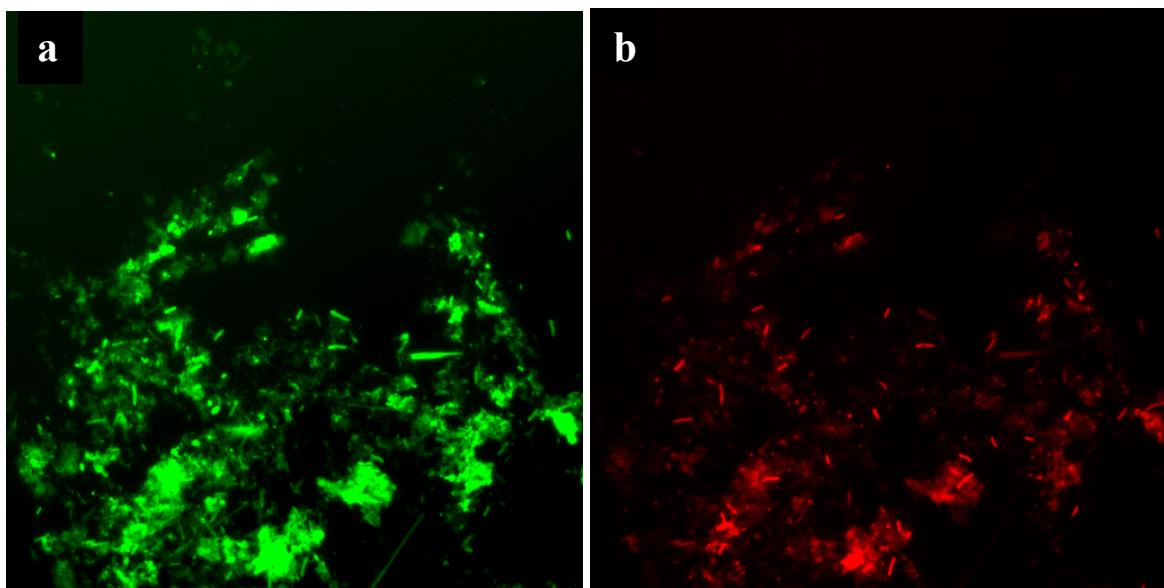
V nadaljevanju smo predmetna stekelca, na katerih smo izvedli *in situ* hibridizacijo s fluorescentnimi sondami, pobarvali še s fluorescentnim barvilm fluorescein izotiocianat (FITC). Cy3 ima absorpcijski maksimum pri 550 nm ter valovno dolžino oddane svetlobe 570 nm, medtem ko ima fluorescein izotiocianat absorpcijski maksimum pri 494 nm ter valovno dolžino oddane svetlobe 521 nm. Ko smo uporabili obe tehniki hkrati, torej fluorescentno *in situ* hibridizacijo in barvanje s FITC, smo upali, da bomo lahko primerjali isti preparat (in ista vidna polja na preparatu) z uporabo različnih optičnih filterov, ki bodo enkrat prepuščali svetlobo Cy3, drugič pa FITC barvila. Tako naj bi barvanje s FITC pod mikroskopom pokazalo vse oziroma večino prisotnih bakterij, medtem ko po *in situ* hibridizaciji s fluorescentno sondou, označeno z barvilm Cy3, odkrijemo le bakterije, ki sodijo v družino *Peptostreptococcaceae*.



Slika 22: Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca *P. anguinu parkelj Č16<sub>26/8/09</sub>* obdelanega s FISH s sondo SimN-Cy3 in barvanega s FITC v istem vidnem polju, pod različnim filtrskim sistemom pri 400-kratni povečavi. a) slika pod filtrskim sistemom U-MSWB, b) slika pod filtrskim sistemom U-MSWG.



Slika 23: Slika epifluorescentne mikroskopije vzorca vsebine zadnjega dela prebavnega trakta *P. anguinu* PT<sub>28/10/08</sub> obdelanega s FISH s sondo SimN-Cy3 in barvanega s FITC v istem vidnem polju, pod različnim filtrskim sistemom pri 400-kratni povečavi. a) slika pod filtrskim sistemom U-MSWB, b) slika pod filtrskim sistemom U-MSWG.



Slika 24: Slika epifluorescentne mikroskopije fekalnega vzorca *P. anguinu* P194<sub>27/07/09</sub> obdelanega s FISH s sondom SimN-Cy3 in barvanega s FITC v istem vidnem polju, pod različnim filtrskim sistemom pri 400-kratni povečavi. a) slika pod filtrskim sistemom U-MSWB, b) slika pod filtrskim sistemom U-MSWG.

Rezultati uporabe obeh tehnik hkrati so prikazani na slikah 22 – 24. Na sliki označeni z "a", kjer smo opazovali fluorescentni signal barvila FITC, očitno sveti več bakterij kot na sliki označeni z "b", vendar pa se je barvilo FITC vezalo tudi na abiotiski material prisoten v hibridiziranem vzorcu. Ta material je lahko posledica kompleksnosti vzorca ali samega postopka *in situ* hibridizacije, je pa žal onemogočil kvantitativno analizo slike. Na slikah je možno opaziti le, da večino bakterijskih celic, ki jih vidimo na tistih slikah, na katerih smo zajemali signal FISH s specifično sondou SimN, vidimo tudi na slikah, kjer smo zajeli signal barvila FITC. Na slikah, kjer pa smo opazovali signal barvila FITC, ne moremo razlikovati med drugimi objekti, ki tudi svetijo, in zato ne moremo ločevati med bakterijskimi celicami in abiotiskimi delci oz. ostanki barvila.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Tako v Sloveniji kot tudi drugje po svetu je mikrobiologija jamskih ekosistemov še posebno pa jamskih živali šele na začetku razvoja. Pa vendar so že začetne raziskave pokazale, da igrajo mikroorganizmi pomembno vlogo pri ohranjanju in delovanju jamskih ekosistemov (Mulec, 2008; Culver, 2005). Bakterije v jamah naseljujejo različne habitate, ki posredno ali neposredno vplivajo na druga živa bitja v jamskem okolju. Poleg mikroorganizmov, prilagojenih na jamski ekosistem, je v jamah mogoče odkriti tudi takšne, ki na razmere v jamah niso prilagojeni. Ti pridejo v jame iz okolice in največkrat hitro propadejo, a njihova biomasa ostane in vpliva na s hranili revno jamsko okolje (Mulec, 2008).

Ena prvih mikrobioloških študij jamskega okolja v Sloveniji je bila izvedena v Planinski jami, kjer sta Sket in Megušar (1977, cit. po Mulec, 2008) preučevala biofilme na jamskih stenah. Takrat in tudi kasneje so raziskovalci lahko uporabljali le tradicionalne mikrobiološke pristope, ki temeljijo na izolaciji in gojenju z vsemi njihovimi omejitvami. Vemo namreč, da lahko na gojiščih v laboratorijskih razmerah uspešno izoliramo in gojimo le manjši delež mikroorganizmov (praviloma pod 1 %), ki naseljujejo naravne ekosisteme (Amann in sod., 1995). V zadnjem obdobju pa so raziskovalci začeli uporabljati tudi molekularne pristope za opis pestrosti mikrobnih združb, ki naseljujejo jamske ekosisteme. Dve novejši raziskavi slovenskih jam (Gerič in sod., 2004; Pašić in sod., 2010), ki sta se ukvarjali z analizo sestave mikrobne združbe jamskih sten (Pajšarjeva jama in Škocjanska jama), kažeta na velik delež po Gramu negativnih bakterij, predvsem iz debla *Proteobacteria* (Pašić in sod., 2010). Do danes pa še nihče ni preučeval vzorce vsebine prebavnega trakta oziroma fekalnih vzorcev živali, ki živijo v podzemskih jamskih ekosistemih s stališča mikrobiologije.

Glavno vprašanje diplomske naloge je bilo, kakšni sta struktura in pestrost mikrobne združbe prebavnega trakta močerila. Po analizi vzorca vsebine prebavnega trakta močerila z epifluorescentnim mikroskopom je bilo razvidno, da so bakterije v vzorcu prisotne, a je njihova morfološka pestrost zelo majhna, kar je presenetljivo, glede na to, da gre za prebavni trakt, ki je sicer poznan kot pester mikrobeni ekosistem, ki ga praviloma naseljuje več tisoč mikrobnih vrst (Kim in sod., 2009; Tap in sod., 2009). Pri diplomski nalogi smo v začetku uporabili vzorce vsebine prebavnega trakta močerila ujetega v Planinski jami. Ker smo lahko dobili vzorec le enega primerka, za zanesljivost rezultatov pa bi praviloma morali analizirati večje število vzorcev, smo v analizo v drugem delu naloge vključili še fekalne vzorce močerilov iz ujetništva.

Da bi bolje razumeli primerljivost vsebine prebavnega trakta in fecesa ter lažje interpretirali rezultate, smo pregledali predhodno objavljene raziskave. Prebavni trakt živali naseljujejo indigene bakterije, ki predstavljajo t.i. normalno prebavno mikrobioto, ter alohtone bakterije, ki so običajno v prebavnem traktu le občasno oziroma jo kolonizirajo le v neobičajnih razmerah (Hao in Lee, 2004) in predstavljajo le manjši delež celotne mikrobne združbe. V normalni prebavni mikrobioti zadnjega dela črevesa večine doslej preučenih živali popolnoma dominirajo bakterije iz le dveh debel: *Firmicutes* in *Bacteroidetes*. To so striktno anaerobne bakterije, ki jih je možno gojiti le v ustreznih razmerah. Zato so rezultati starejših študij, ki so temeljili na konceptu opisa mikrobnih združb po uspešni izolaciji bakterij iz preučevanih vzorcev prebavne vsebine (ali fecesa) pogosto zavajajoči. Razliko v strukturi in pestrosti mikrobne združbe, ki naseljuje različne dele prebavnega trakta in tiste, ki jo odkrijemo v fecesu so z molekularnimi metodami pokazali Eckburg in sodelavci (2005). Ugotovili so, da sta struktura in pestrost mikrobne združbe prebavnega trakta v primerjavi s fecesom istega osebka različni v takšni meri, kot sta različni struktura in pestrost mikrobne združbe prebavnega trakta med različnimi osebkami. Zato se je pri interpretaciji rezultatov ves čas potrebno zavedati, da vzorci vsebine črevesa in fecesa niso popolnoma primerljivi.

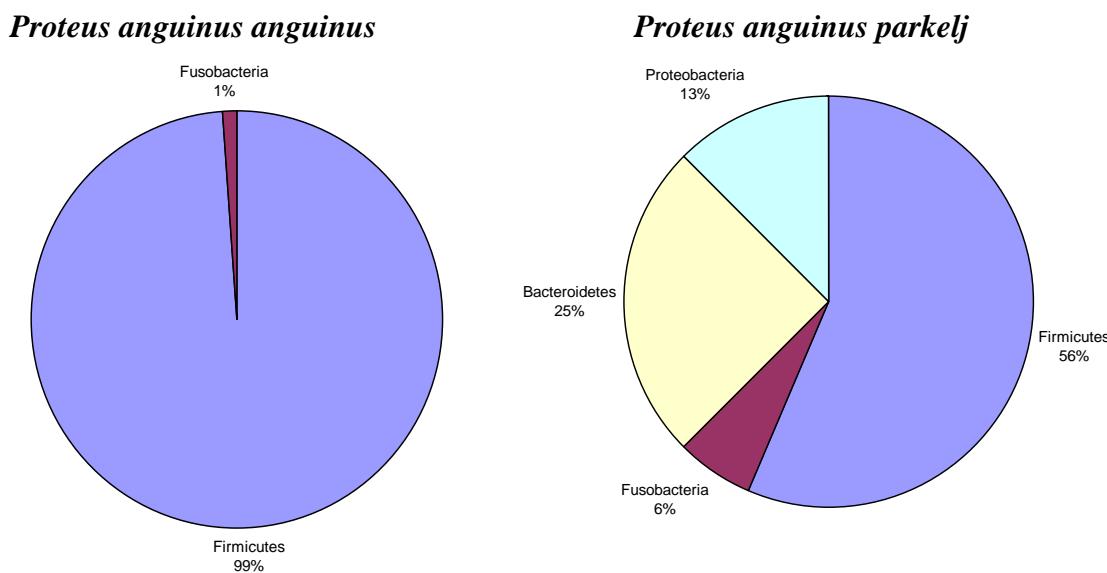
Pri interpretaciji rezultatov dobljenih pri raziskavah prebavnega trakta oziroma fecesa je potrebno upoštevati tudi izbiro metode, ki je bila pri raziskavi uporabljena. Nekateri raziskovalci opozarjajo na nasprotujoče si zaključke ravno zaradi primerjave rezultatov, ki so jih dobili z različnimi metodami izolacije skupne mikrobne DNA, čiščenja le te, pomnoževanja izbranih delov genoma, kloniranja in izbire klonov za sekvenciranje (Zoetendal in sod., 2006). Upoštevati je potrebno tudi dejstvo, da je močeril dvoživka in da živi v pretežno vodnem okolju. Predhodnih molekularnih študij o mikroorganizmih, ki naseljujejo prebavni trakt močerila, še ni bilo, kot tudi doslej še ni znanih objav o strukturi in pestrosti mikrobne združbe v prebavnem traktu katerekoli dvoživke.

Filogenetska analiza sekvenc pridobljenih v tej študiji je pokazala, da je mikrobiološka pestrost prebavnega trakta močerila v resnici majhna. Skoraj 90 % vseh pridobljenih sekvenc se je namreč uvrstilo v deblo *Firmicutes*. Rezultati preliminarne analize sekvenc z orodjem RDP Classifier (Cole in sod., 2005) so pokazali, da je večina sekvenc pridobljenih v tej študiji homolognih sevencam bakterij iz družin *Peptostreptococcaceae* in *Clostridiaceae* (po RDP klasifikaciji). Po filogenetski analizi, ki smo jo izvedli z orodjem MEGA, so se te sekvence uvrstile v enotno skupino z oznako PA 5. Večina sekvenc iz Greengensove baze podatkov (DeSantis in sod., 2006), ki so se tudi uvrstile v to skupino, je bila pridobljena iz prebavnega trakta ali fecesa sesalcev in rib, čistilnih naprav in onesnažene vode. Ena od zanimivih bakterij je sevica seva LA1 psihrofilne bakterije *Clostridium ruminantium* iz podskupine PA 5.1, ki je homologna največ sevencam iz te študije (40). Tudi v skupino PA 5.9 sta se uvrstili sevenci psihrofilnih bakterij, v tem primeru iz vrst *Clostridium gasigenes* (Broda in sod., 2000). V podskupino PA 5.12 pa se je iz Greengensove baze podatkov uvrstila sevica hitinolitične bakterije *Clostridium paraputreficum* (Evvyernie in sod., 2000). Ker je znano, da je močeril plenilec, ki se med

drugim prehranjuje tudi z žuželkami, bi prisotnost hitinolitičnih bakterij lahko pomenilo, da so le te pomemben faktor pri razgradnji hitina v prebavnem traktu.

Ena od sekvenc se je uvrstila v skupino PA 4, kamor so se uvrstile tudi sekvene gigantskih bakterij iz rodu *Epulopiscium*. Pri mikroskopiranju vzorcev vsebine prebavnega traka močerila *P. anguinus parkelj* PT in fecesa črnega močerila *P. anguinus parkelj* Č16 izjemno velikih bakterij nismo opazili, kar pa še ne pomeni, da jih v vzorcih ni bilo. Bakterij takšnih velikosti (800 x 80 µm) nismo pričakovali v naših vzorcih in bi jih pri manjših povečavah lahko zamenjali za dele plena. Pri večjih povečavah pa jih seveda sploh ne bi opazili. Poleg tega ni nujno, da so bakterije, iz katerih smo pridobili omenjene sekvene, v resnici velike bakterije. Pridobljena sekvenca je lahko le daljni sorodnik gigantskih bakterij iz rodu *Epulopiscium*. Tudi v primeru odkritja sorodnih sekvenz iz fecesa oz. vsebine prebavnega traka ježa in prašiča (Ley in sod., 2008; Leser in sod., 2002) avtorji niso omenjali opažanj izjemno velikih bakterij.

V monofiletsko skupino PA 3, kamor sta se uvrstili dve sekvenci te študije, so se uvrstile tudi sekvene fusobakterij iz vrste *Cetobacterium somerae*. To vrsto so doslej raziskovalci najpogosteje odkrivali v vzorcih prebavnega traka in fecesa človeka ter prebavnega traka nekaterih rib (Tsuchiya in sod., 2007). *Cetobacterium* je eden od le štirih doslej poznanih rodov nedavno predlaganega bakterijskega debla *Fusobacteria*. Prve izolate iz vrste *Cetobacterium ceti* so izolirali pred 15 leti iz vzorcev vsebine prebavnega traka pliskavic in kita ščukarja (Foster in sod., 1995), *Cetobacterium somerae* pa pred 9 leti iz človeškega fecesa (Finegold in sod., 2003). Značilnost, ki kaže, da so to prave indigene bakterije prebavnega traka je odpornost izolatov na prisotnost žolčnih soli.



Slika 25: Primerjava strukture bakterijske 16S rDNK knjižnice nepigmentiranega močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*).

Zaradi majhnega števila pridobljenih sekvenč posameznih kloniranj, smo sestavili eno skupno filogenetsko drevo. Ta poteza nam je onemogočila primerjavo vsebine prebavnega trakta nepigmentiranega močerila in fecesa črnega močerila, zato smo naredili še primerjavo strukture mikrobne združbe nepigmentiranega in črnega močerila glede na debla s tortnim grafikonom (Slika 25). Iz slike je možno opaziti, da pri obeh prevladujejo bakterije iz debla *Firmicutes*, katerih število je pri nepigmentiranem močerilu skoraj 100 %. Pa vendar je mikrobnna združba iz fecesa črnega močerila drugačna, saj poleg predstavnikov iz debla *Firmicutes* vsebuje še predstavnike drugih debel (*Bacteroidetes*, *Proteobacteria*) in je tako bolj pestra v primerjavi z nepigmentiranim.

Močeril, katerega vsebino prebavnega trakta smo preučevali v naši študiji, je bil ulovljen v kraški jami Planinska jama. Iz baze podatkov Greengenes se je v različne skupine uvrstilo kar nekaj sekvenč, ki so jih pridobili iz vzorcev vod in sedimentov (odpadne vode, rečni izliv, reke, morske vode). Nekateri raziskovalci opozarjajo, da je mikrobiota prebavnega trakta rib in drugih vodnih živali podobna mikrobnji združbi vode, v kateri žival živijo (Cahill, 1990; Han in sod., 2010; Wu in sod., 2012). Kako pride do kolonizacije prebavnega trakta rib zaenkrat še ni dobro raziskano. Predvidevajo, da na izoblikovanje mikrobske združbe prebavnega trakta rib najprej vpliva prenos mikrobov z ribe na jajčeca ob njihovem izleganju in nato še vodno okolje ter hrana (Austin, 2006; Dhanasiri in sod., 2011; Wu in sod., 2012). Mikroorganizmi iz okolja, ki kolonizirajo prebavni trakt, morajo biti sposobni prilagoditve na razmere v prebavnem traktu. Vsaj doslej pa večina študij, ki obravnavajo to tematiko, temelji na konceptu opisa mikrobnih združb po uspešni izolaciji in identifikaciji gojenih bakterij iz preučevanih vzorcev (Cahill, 1990; Al-Harbi in Uddin, 2003), zato so njihovi rezultati neprimerljivi z rezultati naše študije.

S filogenetsko analizo sekvenč pridobljenih v tej študiji smo ugotovili, da je pestrost vsebine prebavnega trakta in fecesa majhna v primerjavi s pestrostjo mikrobiote prebavnega trakta drugih živali, npr. rib. Mikrobioti prebavnega trakta rib sestavljajo tako aerobne, fakultativno anaerobne kot obligatno anaerobne vrste mikrobov. Sestava mikrobnih združb prebavnega trakta rib je poleg okolja, vode in prehrane odvisna tudi od vrste in tipa rib (sladkovodne in morske). V prebavnem traktu sladkovodnih rib so tako v najbolj pogosto opisovali vrste bakterij iz rodov *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacteroides tipa A*, katerim sledijo *Plesiomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Bacteroides tipa B* in *Fusarium* (Nayak, 2010). Žal pa večina starejših in novejših študij temelji na konceptu opisa mikrobnih združb po uspešni izolaciji bakterij iz preučevanih vzorcev prebavne vsebine in njihovemu gojenju (Austin, 2006). Zaradi pomanjkljivosti gojitvenih metod, ki jih danes poznamo, ne moremo z zanesljivostjo primerjati rezultatov naše študije s predhodnimi raziskavami prebavne vsebine rib. Ena redkih raziskav, kjer so uporabili tudi molekularne metode, je bila izvedena na postrvi (*Oncorhynchus mykiss*), kjer so ugotavliali sestavo in pestrost mikrobiote vzorcev vsebine prebavnega trakta omenjene ribe. Ugotovili so, da večina prisotnih bakterij v preučevanih vzorcih sodi v deblo *Proteobacteria* (več kot 70 %), odkrili pa so tudi sekvenče bakterij iz debla *Bacteroidetes* in *Fusobacteria* (Kim in sod., 2006). Te taksonomske skupine so

prisotne tudi v prebavnem traktu močerila. Pomembna razlika pa je popolna prevlada bakterij iz debla *Firmicutes* v prebavnem traktu močerila, medtem ko sodijo firmikute v prebavnem traktu postrvi med maloštevilčne skupine.

Problem pri analizi rezultatov filogenetske analize ni samo v tem, da rezultatov te študije ni mogoče primerjati s študijami, ki bi bile opravljene na bolj sorodnih gostiteljih, ampak tudi v količini rezultatov. Analizirali smo le en vzorec vsebine prebavnega trakta močerila in le nekaj fekalnih vzorcev črnega in nepigmentiranega močerila, zaradi česar ne moremo trditi, da naši rezultati veljajo za vse primerke te vrste. Močeril je namreč ogrožena vrsta in je zaščiten pred lovom. Dovoljenje za njegov lov in analize s strani VURS-a in ARSO-ta ima le nekaj inštitucij, med drugim tudi oddelek za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, preko katerega smo dobili vse vzorce uporabljeni v tej nalogi. Na leto lahko ujamejo le nekaj primerkov in žrtvujejo le majhno število živali.

Prisotnost dominantne mikrobne populacije v prebavnem traktu močerila smo v nadaljevanju preverjali s fluorescentno *in situ* hibridizacijo, ki omogoča identifikacijo mikroorganizmov v njihovem naravnem okolju. Princip FISH je vezava fluorescentno označene oligonukleotidne sonde na komplementarno sekvenco v celici (Motter in Göbel, 2000). Da bi dobili optimalne rezultate, bi potrebovali oligonukleotidne sonde, ki bi bile specifične za različne skupine bakterij in označene z različnimi fluorescentnimi barvili, kar bi nam omogočilo pregledovanje istih preparatov z epifluorescentnim mikroskopom. Žal smo zaradi omejenega proračuna, saj gre pri tej študiji le za diplomsko nalogu, imeli na voljo le nekaj oligonukleotidnih sond, ki so bile vse označene z enakim fluorescentnim barvilkom Cy3. Prvi rezultati FISH so pokazali, da so bakterije iz družine *Peptostreptococcaceae* prisotne v vseh vzorcih. Ker smo lahko pregledovali le en preparat naekrat, nismo mogli oceniti, ali je delež bakterij iz te družine dejansko tako velik, kot smo pokazali s filogenetsko analizo. Potrdili smo lahko le, da so bakterije v vzorcih prisotne in da so bakterije, na katere se veže oligonukleotidna sonda SimN-Cy3 večinoma paličaste oblike. Ker smo vedeli, da ima barvilo Cy3 absorbcijski maksimum pri 550 nm ter valovno dolžino oddane svetlobe 570 nm, smo poiskali fluorescentno barvilo, ki bi nam omogočil pregled istega preparata pod različnimi optičnimi filteri. Tako je barvilo fluorescein izotiocianat (Miller in Quarles, 1990). Z njim smo naknadno pobarvali preparat, na katerem je potekala *in situ* hibridizacija z oligonukleotidno sondijo SimN-Cy3. Ob opazovanju preparatov pod različnimi filtrskimi sistemi bi predvidoma lahko opazovali vse bakterije prisotne v vzorci in bakterije iz družine *Peptostreptococcaceae* v istem vidnem polju. Žal kljub uporabi barvila FITC nismo uspeli razbrati kakšen je delež peptostreptokokacej v preučevanih vzorcih, ker se je barvilo FITC vezalo še na abiotiski material, ki je bil prisoten v vzorcu.

## SKLEPI

- Mikrobna združba prebavnega trakta močerila ni pестra.
- Mikrobi združbo prebavnega trakta močerila sestavljajo različne bakterijske vrste, medtem ko arhejske vrste v naši študiji nismo dokazali.
- Mikroorganizmi, ki naseljujejo prebavni trakt močerila, sodijo v doslej še neopisane vrste.
- V prebavnem traktu močerila so prisotne tudi bakterije, ki so sorodne gigantskim bakterijam iz rodu *Epulopiscium*.
- Prebavni trakt naseljujejo tudi bakterijske vrste, ki so sorodne hitinolitičnim bakterijam in psihrofilnim bakterijam.
- Z metodo FISH smo odkrili in pokazali prisotnost dominantnih bakterijskih vrst družine *Peptostreptococcaceae* v vzorcih prebavnega trakta močerila.

## 6 POVZETEK

Močeril (*Proteus anguinus*) je največji poznani jamski vretenčar, ki živi v specifičnem jamskem okolju. Zanj je značilna neverjetno dolga življenjska doba in zmožnost preživetja dolgotrajnega stradanja. Kaj je tisto, kar mu omogoča te značilnosti, do danes še ni bilo odkrito. Ker v zadnjih letih znanstveniki odkrivajo, kako pomembni so mikroorganizmi, ki naseljujejo prebavni trakt živali, bi lahko mikrobiota prebavnega trakta močerila igrala pomembno vlogo pri pripravi in obdelavi hranil za gostitelja. Prebavna mikrobiota ima namreč pomembno funkcijo pri mnogih procesih, ne le pri razkroju hrane in obrambi pred nezaželenimi mikroorganizmi.

V okviru diplomske naloge smo torej žeeli podrobnejše spoznati mikrobiološko združbo prebavnega trakta močerila. Ker vemo, da večine mikroorganizmov, ki živijo v kompleksnih ekosistemih, kot je prebavni trakt živali, ne znamo gojiti, smo se odločili, da bomo pri našem delu uporabili predvsem molekularno biološke metode, ki temeljijo na odkrivanju in analizi mikrobne DNK.

S filogenetsko analizo smo ugotovili, da mikrobna združba vsebine prebavnega trakta in fecesa močerila ni pesta ter da precejšen del mikroorganizmov, ki naseljujejo prebavni trakt močerila, sodi v doslej še neopisane vrste. Ko smo sekvene, ki smo jih pridobili v tej študiji, primerjali z dostopnimi sekvencami v bazi podatkov RDP II in Greengenes, smo ugotovili, da največji delež sekvenc pripada bakterijskemu deblu *Firmicutes* (skoraj 90 %) in le manjši delež sekvenc deblom *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* in *Proteobacteria*. Večina sekvenc iz Greengenove baze podatkov, ki so se tudi uvrstile v to skupino, je bila pridobljena iz prebavnega trakta ali fecesa živali in tudi človeka ter onesnažene vode. Med drugim so se v filogenetsko analizo uvrstile tudi sekvene psihrofilnih in hitinolitičnih bakterij. V eno izmed podskupin se je uvrstila tudi bakterijska vrsta *Epulopiscium*, ki je gigantska bakterija odkrita v prebavnem traktu tropske koralne rive. Take bakterije pod mikroskopom nismo videli, kar pa še ne pomeni, da ni bila prisotna v prebavnem traktu. Tako velike bakterije nismo pričakovali in je zato tudi nismo iskali.

Ker smo žeeli pokazati prisotnost dominantne mikrobne populacije v vzorcih močerila, smo vzorce analizirali s tehniko fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH). Za izvedbo tehnike smo potrebovali ustrezno sondu, ki bi se specifično vezala na komplementarne nukleotidne sekvene tarčnih bakterijskih celic iz debla *Firmicutes* in družine *Peptostreptococcaceae*. Ker taka sonda še ni bila poznana, smo jo pripravili sami. Ugotovili smo, da je dominantna skupina bakterij sicer prisotna v vzorcih vsebine prebavnega trakta in fecesa močerila, ni pa bilo mogoče določiti kakšen je bil njen delež. Zato smo predmetna stekelca, na katerih smo izvedli FISH, pobrali še s fluorescentnim barvilom fluorescein izotiocianat (FITC), ki ima drugačno valovno dolžino oddane svetlobe od barvila Cy3, s katerim so bile označene sonde. Ob uporabi obeh tehnik hkrati smo lahko primerjali isti preparat in ista vidna polja z različnimi optičnimi filteri, ki so

enkrat prepuščali barvilo FITC (večina prisotnih bakterij), drugič pa svetlobo Cy3 (bakterije iz v družine *Peptostreptococcaceae*). Ker se je barvilo FITC vezalo tudi na abiotiski material prisoten v hibridiziranem vzorcu, kvantitativne analize slike nismo mogli izvesti. S tehniko FISH smo pokazali le, da je dominantna skupina bakterije prisotna v vseh vzorcih.

V diplomski nalogi smo uporabili le en vzorec vsebine prebavnega trakta in nekaj vzorcev fecesa močerila. Da bi lahko potrdili ali ovrgli rezultate, bi bilo potrebno analizirati večje število vzorcev in uporabiti še katero drugo molekularno tehniko.

## 7 VIRI

- Abraham W.-R., Macedo J.A., Gomes L.H., Tavare F.C.A. 2007. Occurrence and resistance of pathogenic bacteria along the Tietê river downstream of São Paulo in Brazil. *Clean – Soil, Air, Water*, 35, 4: 339-347
- Akasaka H., Izawa T., Ueki K., Ueki A. 2003. Phylogeny of numerically abundant culturable anaerobic bacteria associated with degradation of rice plant residue in Japanese paddy field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 149-161
- Al-Harbi H.A., Uddin N. 2003. Quantitative and qualitative studies on bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus x O. aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture Research*, 34: 43-48
- Aljančič M. 1989. "Človekova" ribica in druga imena naše jamske dvoživke. *Proteus*, 51: 365-366
- Aljančič G., Aljančič M. 1998. Žival meseca oktobra. Človeška ribica (*Proteus anguinus*). *Proteus*, 61, 2: 83-87
- Aljančič M., Bulog B., Kranjc A., Josipović D., Sket B., Skoberne P., Hodalič A., Habič P. 1993. *Proteus: skrivnostni vladar kraške teme*. Ljubljana, Vitrum: 75 str.
- Amann R.I., Krumholz L., Stahl D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, 172: 762-770
- Amann R., Ludwig W. 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 555-565
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59, 1: 143-169
- Angert E.R., Clements K.D., Pace N.R. 1993. The largest bacterium. *Nature*, 362: 239-241
- Ashelford K.E., Weightman A.J., Fry J.C. 2002. PRIMROSE: a computer programme for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and primers in conjunction with RDP-II database. *Nucleic Acids Research*, 30, 15: 3481-3489

- Ashelford K.E. 2010a. OrientationChecker 1.0. Cardiff, Cardiff University School of Medicine  
<http://www.bioinformatics-toolkit.org>
- Ashelford K.E. 2010b. OligoCheck 1.0. Cardiff, Cardiff University School of Medicine  
<http://www.bioinformatics-toolkit.org>
- Austin B. 2006. The bacterial microflora of fish, revised. *Scientific World Journal*, 6: 931-945
- Bagge E., Persson M., Johansson K.-E. 2010. Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 5: 1549-1565
- Barton H.A. 2006. Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*, 68, 2: 43-54
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62: 293-300
- Bizjak Mali L., Bulog B. 2004. Histology and ultrastructure of the gut epithelium of the neotenic cave salamander, *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *Journal of Morphology*, 259: 82-89
- Broda D.M., Saul D.J., Lawson P.A., Bell R.G., Musgrave D.R. 2000. *Clostridium gasigenes* sp.nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 107-118
- Bulog B. 1994. Dve desetletji funkcionalno-morfoloških raziskav pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). *Acta Carsologica*, 23: 247-263
- Cahill M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: a review. *Microbial Ecology*, 19: 21-41
- Clements K.D., Bullivant S. 1991. An unusual symbiont from the gut of surgeonfishes may be the largest known prokaryote. *Journal of Bacteriology*, 173, 17: 5359-5362
- CodonCode Corporation. 2010. CodonCode aligner version 3.7.1. Centerville, Massachusetts  
[www.phrap.com](http://www.phrap.com)
- Cole J.R., Chai B., Marsh T.L., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., Chandra S., McGarrell D.M., Schmidt T.M., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2003. The Ribosomal Database Project

(RDPII): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. Nucleic Acids Research, 31, 1: 442-443

Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D.M., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDPII): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research, 33: 294-296

Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Research, 37: 442-443

Configliachi P., Rusconi M. 1818. Del proteo anguino di Laurenti. Monografia. Galeazzi, VII, Pavia: 119 str.

Cowan D., Meyer Q., Stafford W., Muyanga S., Cameron R., Wittwer P. 2005. Metagenomic gene discovery: past, present, future. Trends in Biotechnology, 23, 6: 321-329

Culver D.C. 2005. Microbes. V: Encyclopedia of caves. Culver D.C., White W.B. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 369-371

Daims H., Bruhl A., Amann R., Schleifer K.H., Wagner M. 1999. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. Systematic and Applied Microbiology, 22, 3: 434-444

Danulat E. 1986. Role of bacteria with regard to chitin degradation in the digestive tract of the cod *Gadus morhua*. Marine Biology, 90: 335-343

Deban S.M., O'Reilly J.C., Nishikawa K.C. 2001. The evolution of the motor control of feeding in amphibians. American Zoologist, 41: 1280-1298

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Applied and Environmental Microbiology, 72, 7: 5069-5072

Dhanasiri A.K.S., Brunvold L., Brinchmann M.F., Korsnes K., Bergh Ø. Kiron V. 2011. Changes in the intestinal microbiota of wild atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. Microbial Ecology, 61: 20-30

- Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J.-P., Raoult D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 10: 3623-3630
- Duncan S., Glover L.A., Killham K., Prosser J.I. 1994. Luminescence – based detection of activity of starved and viable but nonculturable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 30, 4: 1308-1316
- Durand J.P. 2005. Salamanders. V: *Encyclopedia of caves*. Culver D.C., White W.B. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 485-491
- Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 5728: 1635-1638
- Evvyernie D., Yamazaki S., Morimoto K., Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. 2000. Identification and characterization of *Clostridium paraputrificum* M-21, a chitinolytic, mesophilic and hydrogen-producing bacterium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 596-601
- Finegold S.M., Väistönen M.L., Molitoris D.R. Tomzynski T.J., Song Y., Liu C., Collins M.D., Lawson P.A. 2003. *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 171-181
- Foster G., Ross H.M., Naylor R.D., Collins M.D., Ramos C.P., Fernandez Garayzabal F., Reid R.J. 1995. *Cetobacterium ceti* gen. nov., sp. nov., a new gram-negative obligate anaerobe from sea mammals. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 3: 202-206
- Gerič B., Pipan T., Mulec J. 2004. Diversity of culturable bacteria and meifauna in the epikarst of Škofcanske jame caves (Slovenia). *Acta Carsologica*, 33, 1: 301-309
- Giovannoni S.J., DeLong E.F., Olsen G.J., Pace N.R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, 170, 2: 720-726
- Han S., Liu Y., Zhou Z., He S., Cao Y., Shi P., Yao B., Rings E. 2010 Analysis of bacterial diversity in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) based on 16S rDNA gene sequences. *Aquaculture Research*, 42: 47-56
- Hao W.-L., Lee Y.-K. 2004. Microflora of the gastrointestinal tract. *Methods in Molecular Biology*, 268: 491-502

Head I.M., Saunders J.R., Pickup R.W. 1998. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, 35: 1-21

Hervant F., Mathieu J., Durand J. 2001a. Behavioral, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *Journal of Experimental Biology*, 204: 269-281

Hervant F., Mathieu J., Durand J.P. 2001b. Circadian rhythmicity, respiration and behavior in hypogea and epigean salamanders. *Natura Croatia*, 10, 3: 141-152

Ikeda R.A., Richardson C.C. 1986. Interactions of the RNA polymerase of bacteriophage T7 with its promoter during binding and initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 83: 3614-3618

Istenič L. 1987. O najdbi črne človeške ribice. *Proteus*, 49: 243-244

John H., Birnstiel M., Jones K. 1969. RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level. *Nature*, 223: 582-587

Južnič S. 2006. Karst research in the 19<sup>TH</sup> century – Karl Dežmans (1821-1889) work. *Acta Carsologica*, 35, 1: 140-148

Kaksonen A.H., Plumb J.J., Robertson W.J., Franzmann P.D., Gibson J.A.E., Puhakka J.A. 2004. Culturable diversity and community fatty acid profiling of sulfate-reducing fluidized-bed reactors treating acidic, metal-containing wastewater. *Geomicrobiology Journal*, 21, 7: 469-480

Khan W.I., Collins S.M. 2005. Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunology*, 26: 319-326

Kim D.-H., Brunt J., Austin B. 2006. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal af Applied Microbiology*, 102: 1654-1664

Kim M., McSweeney C.S., Morrison M., Yu Z. 2009. An *in silico* generated census of the rumen bacterial microbiome. *Microbial Ecology*, 57: 562-588

Lane D.J., Pace B., Olsen G.J., Stahl D.A., Sogin M.L., Pace N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequence for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82: 6955-6959

- Leser T.D., Amenuvor J.Z., Jensen T.K., Lindecrona R.H., Boye M., Moller K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2: 673-69
- Ley R.E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P.J., Ramey R.R., Bircher J.S., Schlegel M.L., Tucker T.A., Schrenzel M.D., Knight R., Gordon J.I. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320, 5883: 1647-1651
- Liesack W., Weyland H., Stackebrandt E. 1991. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria. *Microbial Ecology*, 21: 191-198
- Lin B., Hyacinthe C., Bonneville S., Braster M., Van Cappellen P., Röling W.F.M. 2007. Phylogenetic and physiological diversity of dissimilatory ferric iron reducers in sediments of the polluted Scheldt estuary, Northwest Europe. *Environmental Microbiology*, 9, 8: 1956-1968
- Martin-Carnahan A., W. Joseph S. 2005. Order XII. *Aeromonadales* ord. nov. V: Bergey's manual of systematic bacteriology Vol. 2. 2<sup>nd</sup> ed. The *Proteobacteria*. Part B: The *Gammaproteobacteria*. Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. (eds.). New York, Springer-Verlag: 556-578
- Megušar F., Sket B. 1977. On the nature of some organic covers on the cave walls. Proceedings of the 6th international congress of speleology:159-161. Cit. po Mulec J. 2008. Microorganisms in hypogean: examples from slovenian karst caves. *Acta Carsologica*, 37, 1: 153-160
- Miller S., Quarles J.M. 1990. Flow cytometric identification of microorganisms by dual staining with FITC and PI. *Cytometry*, 11: 667-675
- Moter A., Göbel U.B. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 85-112
- Mulec J. 2008. Microorganisms in hypogean: examples from slovenian karst caves. *Acta Carsologica*, 37, 1: 153-160
- Mulec J., Zalar P., Zupan Hajna N., Rupnik M. 2002. Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia). *Acta Carsologica*, 31, 2: 177-187
- Nayak S.K. 2010. Role of gastrointestinal mikrobiota in fish. *Aquaculture Research*, 41: 1553-1573

- Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaird J., Weishuber A., Amman R.I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. Journal of Bacteriology, 178, 19: 5636-5643
- Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. Journal of Microbiology, 43: 93-100
- Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., Stahl D.A. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. Annual Review of Microbiology, 40: 337-365
- Ouwerkerk D., Klieve A.V., Foster R.J., Templeton J.M., Maguire A.J. 2005. Characterisation of culturable anaerobic bacteria from forestomach of an eastern grey kangaroo, *Macropus giganteus*. Letters in Applied Microbiology, 41: 327-333
- Owczarzy R., Tataurov A.V., Wu Y., Manthey J.A., McQuisten K.A., Almabazi H.G., Pedersen K.F., Lin Y., Garretson J., McEntaggart N.O., Sailor C.A., Dawson R.B., Peek A.S. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. Nucleic Acids Research, 36: 163-169
- Pardue M.L., Gall J.G. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 64(6): 600–604
- Pašić L., Kovče B., Sket B., Herzog-Velikonja Blagajana. 2010. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. FEMS Microbiology Ecology, 71: 50-60
- Prober J.M., Trainor G.L., Dam R.J., Hobbs F.W., Robertson C.W., Zagursky R.J., Cocuzza A.J., Jensen M.A., Baumeister K. 1987. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain terminating dideoxynucleotides. Science, 238, 4825: 336-341
- Rawls J.F., Mahowald M.A., Ley R.E., Gordon J.I. 2006. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. Cell, 127, 2: 423-433
- Roller C., Wagner M., Amann R., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1994. In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. Microbiology, 140: 2849-2858
- Roszak D.B., Colwell R.R. 1987 Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiological Reviews, 51, 3: 365-379

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491

Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425

Sakamoto M., Kitahara M., Menno Y. 2007. *Parabacteroides johnsonii* sp. nov., isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 293-296

Sallam A., Steinbuchel A. 2009. *Clostridium sulfidigenes* sp. nov., a mesophilic, proteolytic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium isolated from pond sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 7: 1661-1665

Sander M., Schmieger H. 2001. Method for host-independent detection of generalized transducing bacteriophages in natural habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4: 1490-1493

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463-5467

Shaw R.T. 1999. Proteus for sale and for science in the 19TH century. *Acta Carsologica*, 28, 1: 229-304

Simpson J.M., Santo Domingo J.W., Reasoner D.J. 2004. Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiology Ecology*, 47, 1: 65-75

Sket B. 1993. Nova rasa človeške ribice (Kako se "naredi" novo podvrsto ali članek o članku). *Proteus*, 56: 3-11

Sket B. 1997. Distribution of Proteus (*Amphibia: Urodea: Proteidae*) and its possible explanation. *Journal of Biogeography*, 24: 263-280

Sket B. 1999. The nature of biodiversity in hypogean waters and how it is endangered. *Biodiversity and Conservation*, 8: 1319-1338

Sket B. 2007. Kaj vemo in kaj si mislimo o človeški ribici. Utrinki iz zgodovine in nekaj novosti. *Proteus*, 70, 1: 14-27

- Stevens C.E., Hume I.D. 2004. Comparative physiology of the vertebrate digestive system. 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge, Cambridge University Press: 400 str
- Stevens E.C., Hume I.D. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews*, 78, 2: 393-427
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 8: 1596-1599
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J.-P., Ugarte E., Muñoz-Tamayo R., Paslier D.L.E., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11, 10: 2574-2584
- Taubel M., Rintala H., Pitkaranta M., Paulin L., Laitinen S., Pekkanen J., Hyvarinen A., Nevalainen A. 2009. The occupant as a source of house dust bacteria. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124, 4: 834-840
- Tsuchiya C., Sakata T., Sugita H. 2007. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Letters in Applied Microbiology*, 46: 43-48
- Vandamme P., Vancanneyt M., Van Belkum A., Segers P., Quint W.G.V., Kersters K., Paster B.J., Dewhurst F.E. 1996. Polyphasic analysis of strains of the genus *Capnocytophaga* and centers for disease control group DF-3. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 3: 782-791
- Yoshida N., Takahashi N., Hiraishi A. 2005. Phylogenetic characterization of a polychlorinated-dioxin-dechlorinating microbial community by use of microcosm studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 8: 4325-4334
- Wagner M., Amann R., Lemmer H., Schleifer K.-H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for *Proteobacteria*: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 5: 1520-1525
- Wallner G., Amann R., Beisker W. 1993. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14:136-143

- Wang C.-Y., Wang Y. 1996. The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology*, 142: 1107-1114
- Wang C.-Y., Wang Y. 1997. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 12: 4645-4650
- Watanabe T., Asakawa S., Nakamura A., Nagaoka K., Kimura M. 2004. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiology Letters*, 232, 2: 153-163
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 2: 697-703
- Wilson B., Danilowicz B.S., Meijer W.G. 2008. The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*. *Microbial Ecology*, 55, 3: 425-434
- Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51, 2: 221-271
- Wright A.D.G., Pimm C. 2003. Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 2: 337-349
- Wu S., Wang G., Angert E.R., Wang W., Li W., Zou H. 2012. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine. *PloS ONE*, 7, 2: e30440, doi: 10.1371/journal.pone.0030440: 11 str
- Zimmer R., Gibbins A.M.V. 1997. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics*, 42: 217-226
- Zoetendal E.G., Cheng B., Koike S., Mackie R.I. 2004. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5: 31-48
- Zoetendal E.G., Vaughan E.E., de Vos W.M. 2006. A microbial world within us. *Molecular Microbiology*, 59, 6: 1639-1650
- Zupan Hajna N., Pruner P., Mihevc A., Schnabl P., Bosák P. 2008. Cave sediments from Postojnska-Planinska cave system (Slovenia): evidence of multi-phase evolution in epiphreatic zone. *Acta Carsologica*, 37, 1: 63-86

**ZAHVALA**

## PRILOGE

PRILOGA A: Specifični začetni oligonukleotidi pridobljeni s programom Primrose (Ashelford in sod., 2002).

Značilnosti ostalih specifičnih začetnih oligonukleotidov pridobljenih s programom Primrose. V analizo smo vključili vse v bazi shranjene sekvence, t.j. 836814 sekvenc. Tarčne sekvence so bili klonirane okoljske sekvence in sekvence tipskih in netipskih izolatov rodu "*Peptostreptococcus incertae sedis*" (v skupini je bilo 3749 sekvenc). Podatki veljajo za dan 30/04/2009.

**Priloga A1:** Ostali začetni oligonukleotidi, odkriti s programom "Primrose", ki so se prilegali na tarčne sekvence.

ZO	Zaporedje ZO (5'-3')	Dolžina ZO	% GC baznih parov	Mesto naleganja	Zadetki brez napake			Zadetki z eno napako			Zadetki z dvema napakama		
					Vsi zadetki	Spec. zadetki	Nespec. zadetki	Vsi zadetki	Spec. zadetki	Nespec. zadetki	Vsi zadetki	Spec. zadetki	Nespec. zadetki
A	TCAGTTCAAAGGCTTACT	19	36,8	562.	120	94	26	1318	1094	224	2383	1596	787
B	(N)TTTCTCAGTTCAAAG	16	31,3	569.	102	93	9	1326	940	386	4550	1460	3090
C	CTTGATATTCCRCCATG	19	31,6	154.	13	8	5	117	70	47	2754	1208	1546
D	AAGTTCTCAGTTCAAAG	19	31,6	569.	102	93	9	1014	935	79	2302	1446	856
E	GTTTCTCAGTTCAAAGGC	19	42,1	567.	102	93	9	1018	931	87	2312	1116	1196
F	CCTGCACTCAAGTCTTT	17	47,1	580.	10	0	10	1036	340	696	11163	2359	8804
G	CCATGCGAATCTCTTAT	17	41,2	142.	292	261	31	513	467	46	1420	884	536
H	GAAATCCATGCGAATCTCT	19	42,1	145.	273	245	28	432	396	36	594	530	64
I	AGAAAATCCATGCGAATCTC	19	42,1	146.	272	244	28	433	397	36	650	531	119
J	AAGAAATCCATGCGAATCT	19	36,8	147.	271	243	28	434	397	37	664	490	174
K	CAGTTCAAAAGCTTACT	18	33,3	562.	321	201	120	3051	2565	486	13102	2674	10428
L	TCCTCCTCAAGTACCGTCA	19	52,6	415.	3325	2981	344	7858	3094	4764	17209	3151	14058
M	(N)CCTCTGACTTAAGAACCAACC	21	47,6	519.	1147	1071	76	1253	1120	133	10705	1699	9006
N	CTCTGTCCTCAAGGAAGAT	19	47,4	394.	3335	3103	232	3540	3223	317	4004	3254	750
O	CAGTTCAAAAGCTTAC	17	35,3	563.	398	201	197	3532	2488	1044	14653	2584	12069
P	CAGTGTCAAGTTACAGTCCAGA	21	47,6	672.	3425	1699	1726	20477	2891	17586	68337	2972	65365