

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Brigita NOGRAŠEK

**MIKROBIOLOŠKO-GENETSKA ANALIZA ČREVESNE VSEBINE  
KOPENSKEGA RAKA ENAKONOŽCA *Porcellio scaber***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**MICROBIOLOGICAL AND GENETIC ANALYSIS OF INTESTINE  
CONTENT OF TERRESTRIAL ISOPOD CRUSTACEAN  
*Porcellio scaber***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in recenzenta prof. dr. Miklavža Grabnarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rok Kostanjšek  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Miklavž Grabnar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Brigita Nograšek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579:575:595.3(043.2)=163.6
KG	kopenski raki enakonožci / mikrobiota prebavil / 16S rRNA / celulaze / hitinaze / <i>Stenotrophomonas</i> sp. / hemolizin
AV	NOGRAŠEK, Brigita
SA	AMBROŽIČ AVGUŠTIN Jerneja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	MIKROBIOLOŠKO-GENETSKA ANALIZA ČREVESNE VSEBINE KOPENSKEGA RAKA ENAKONOŽCA <i>Porcellio scaber</i>
TD	Diplomsko delo
OP	XII, 73 str., 10 pregl., 9 sl., 4 pril., 90 vir
IJ	sl
JJ	sl / en
AI	Iz vzorcev vsebine prebavnega trakta smo na prilagojenih in redčenih gojiščih za izolacijo mikoplazem poskušali osamiti predstavnike nedavno opisanih paličastih bakterij ' <i>Candidatus Bacilloplasma</i> ', ki so pritrjene na kutikularne trne papilatne regije zadnjega dela črevesa navadnega prašička (Crustacea, Isopoda, <i>Porcellio scaber</i> ). Pripadnikov mikoplazem nismo uspeli vzgojiti, smo pa osamili vrsto zanimivih bakterijskih izolatov, domnevno predstavnikov indigene mikrobiote. S primerjalno analizo nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNA smo izolate uvrstili v tri bakterijska debla ( <i>Proteobacteria</i> , <i>Actinobacteria</i> in <i>Firmicutes</i> ) in znotraj teh v 10 rodov. Ugotovili smo, da večina sevov slabo ali sploh ne raste pri 37°C, da so štirje sevi fotokromogeni in da večina izolatov razgrajuje CMC-celulozo, en izolat pa tudi hitin. Pri dveh sevih smo odkrili hemolitično aktivnost in genski zapis, ki hemolizin kodira pri sevu <i>Stenotrophomonas</i> sp. P7a-A1, molekulsko klonirali in ga opredelili. Ugotovili smo, da nobeden od kloniranih odprtih bralnih okvirov ni podoben že opisanim hemolizinom, s subkloniranjem in aktivnostnimi testi pa smo pokazali, da hemolitično aktivnost posredujejo dva oz. trije od 12 <i>orf</i> . Preučili smo tudi občutljivost oz. odpornost izolatov na nekatere antibiotike in ugotovili, da so izolati iz rodov <i>Stenotrophomonas</i> in <i>Ochrobactrum</i> odporni proti večini testiranih antibiotikov, izolati iz rodov <i>Enhydrobacter</i> in <i>Microbacterium</i> pa nasprotno občutljivi za vse oz. večino antibiotikov. Vsi izolati so občutljivi za rifampin.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 579:575:595.3 (043.2)=163.6
- CX terrestrial isopod crustacean / intestine microbiota / 16S rRNA / cellulase / chitinase / *Stenotrophomonas* sp. / hemolysin
- AU NOGRAŠEK, Brigita
- AA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2010
- TI MICROBIOLOGICAL AND GENETIC ANALYSIS OF INTESTINE CONTENT OF TERRESTRIAL ISOPOD CRUSTACEAN *Porcellio scaber*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XII, 73 p., 10 tab., 9 fig., 4 ann., 90 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB Samples from the gastrointestinal tract contents were used for isolation attempts of recently described rod-shaped bacteria '*Candidatus* Bacilloplasma' that attach to the cuticular spines of the papillate region of the *Porcelio scaber* (Crustacea, Isopoda) hindgut. Since these bacteria were affiliated to the microbial group of mycoplasmas, adapted and diluted media for isolation of mycoplasmas were used. The isolation of mycoplasmas was not successful, however, other interesting bacterial isolates, apparently members of the indigenous microbiota, were recovered. The isolates were identified as members of 10 different microbial genera belonging to three bacterial phyla (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, and *Firmicutes*) by comparative sequence analysis of 16S ribosomal RNA genes. Most of the isolated strains grew poorly or not at all at 37°C, four of them were photochromogenic, and most of them hydrolyzed CMC-cellulose. One isolate hydrolyzed chitin, too. Two isolates were found to possess hemolytic activity and the gene, coding for the hemolysis in *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 was cloned and sequenced. None of the identified open reading frames was found to be similar to already known hemolysins, however, subcloning and subsequent activity tests showed that two or three of the identified *orf*'s confer hemolytic activity. Susceptibility and resistance towards antibiotic drugs was tested too and isolates from the genera *Stenotrophomonas* and *Ochrobactrum* were found to be resistant to most of the used antibiotics. In contrast, isolates from the genera *Enhydrobacter* and *Microbacterium* were susceptible to most of the used antibiotics. All of them were susceptible to rifampin, however.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
<b>1 UVOD</b>	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	2
2.1 NAVADNI PRAŠIČEK ( <i>Porcellio scaber</i> )	2
2.2 ZGRADBA PREBAVILA IN PREBAVA <i>P. scaber</i>	3
2.3 MIKROORGANIZMI V PREBAVILIH KOPENSKIH ENAKONOŽCEV	5
<b>2.3.1 Bakterije v prebavilih</b>	6
<b>2.3.2 Mikroorganizmi v prebavnih žlezah</b>	8
2.4 NOVI NAČINI IZOLACIJE MIKROORGANIZMOV IZ OKOLJA	8
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	10
3.1 POSKUSNE ŽIVALI	10
3.2 IZOLACIJA BAKTERIJ IN GOJENJE ČISTIH KULTUR	10
3.3 FENOTIPSKA OPREDELITEV BAKTERIJSKIH IZOLATOV	12
<b>3.3.1 Barvanje po Gramu</b>	12
<b>3.3.2 Rast pri temperaturi 37°C</b>	12
<b>3.3.3 Fotokromogenost</b>	13
<b>3.3.4 Hemolitična aktivnost</b>	13
<b>3.3.5 Celulazna in hitinolitična aktivnost</b>	13
<b>3.3.6 Občutljivost za protimikrobne snovi</b>	14
3.4 IZOLACIJA KROMOSOMSKE DNA	14
3.5 POMNOŽEVANJE 16S rDNA V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)	15
3.6 HORIZONTALNA AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA PRODUKTOV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO	16

3.7	UGOTAVLJANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA OZ. DELA GENA ZA 16S rRNA	17
3.8	GENETSKA OPREDELITEV ZAPISA ZA HEMOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJSKEGA IZOLATA <i>Stenotrophomonas</i> sp. P7A-A1	18
<b>3.8.1</b>	<b>Kloniranje</b>	18
<b>3.8.2</b>	<b>Restrikcija plazmidnega vektorja pUC19 in kromosomske DNA</b>	18
<b>3.8.3</b>	<b>Ligacija</b>	19
<b>3.8.4</b>	<b>Priprava kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5</b>	19
<b>3.8.5</b>	<b>Transformacija</b>	19
<b>3.8.6</b>	<b>Izolacija plazmidne DNA s CTAB in Tritonom X-100 (Del Sal in sod., 1988)</b>	20
<b>3.8.7</b>	<b>Restrikcija plazmidne DNA</b>	20
<b>3.8.8</b>	<b>Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja DNA vključka pHEM</b>	21
<b>3.8.9</b>	<b>Subkloniranje</b>	22
3.8.9.1	Priprava plazmidne DNA klona pHEM	22
3.8.9.2	Restrikcija 11,3 kbp DNA fragmenta	22
3.8.9.3	Ligacija, transformacija in ugotavljanje velikosti vključka DNA	24
3.9	GOJIŠČA, RAZTOPINE, PUFRI, ENCIMI	25
<b>3.9.1</b>	<b>Gojišča</b>	25
<b>3.9.2</b>	<b>Raztopine, pufri, encimi</b>	28
3.9.2.1	Barvanje po Gramu	28
3.9.2.2	Celulazna aktivnost	29
<b>3.9.3</b>	<b>Kemikalije, pufri in encimi za izolacijo DNA</b>	29
3.9.3.1	Izolacija kromosomske DNA	29
3.9.3.2	Izolacija plazmidne DNA	30
<b>3.9.4</b>	<b>Kemikalije za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)</b>	30
<b>3.9.5</b>	<b>Horizontalna agarozna gelska elektroforeza</b>	30
<b>3.9.6</b>	<b>Kemikalije, encimi in pufri, ki smo jih uporabili za kloniranje in subkloniranje zapisa za hemolitično aktivnost seva <i>Stenotrophomonas</i> sp. P7a-A1</b>	31
3.10	BAKTERIJSKI SEVI	33
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	34

4.1	IZOLACIJA BAKTERIJ IN GOJENJE ČISTIH KULTUR	34
4.2	IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV	36
4.3	FENOTIPSKA OPREDELITEV BAKTERIJSKIH IZOLATOV	41
<b>4.3.1</b>	<b>Rast pri temperaturi 37°C</b>	41
<b>4.3.2</b>	<b>Fotokromogenost</b>	41
<b>4.3.3</b>	<b>Hemolitična aktivnost</b>	44
<b>4.3.4</b>	<b>Celulazna in hitinolitična aktivnost</b>	44
<b>4.3.5</b>	<b>Občutljivost za protimikrobne snovi</b>	46
4.4	GENETSKA OPREDELITEV ZAPISA ZA HEMOLITIČNO AKTIVNOST IZOLATA <i>Stenotrophomonas</i> P7A-A1	48
<b>4.4.1</b>	<b>Kloniranje in analiza nukleotidnega zaporedja regije, ki kodira hemolitično aktivnost</b>	48
<b>4.4.2</b>	<b>Subkloniranje</b>	52
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	55
5.1	RAZPRAVA	55
<b>5.1.1</b>	<b>Izolacija in identifikacija bakterijskih izolatov</b>	55
<b>5.1.2</b>	<b>Fenotipska opredelitev bakterijskih izolatov</b>	56
<b>5.1.3</b>	<b>Celulolitična aktivnost</b>	57
<b>5.1.4</b>	<b>Hitinolitična aktivnost</b>	58
<b>5.1.5</b>	<b>Hemolitična aktivnost</b>	59
<b>5.1.6</b>	<b>Občutljivost protimikrobne snovi</b>	61
5.2	SKLEPI	62
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	63
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	66
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
<b>Preglednica 1:</b> Bakterije v prebavilu kopenskih rakov enakonožcev	5
<b>Preglednica 2:</b> Gojišča, ki smo jih uporabili za izolacijo bakterij iz različnih vzorcev zadnjega črevesa sedmih kopenskih rakov enakonožcev <i>P. scaber</i>	11
<b>Preglednica 3:</b> Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in reakcijah ugotavljanja nukleotidnega zaporedja	16
<b>Preglednica 4:</b> Uporabljene restriktaze, organizmi, od koder so bile izolirane, restriksijska mesta, tip koncev, ki nastanejo po restrikciji in pripadajoči pufri	23
<b>Preglednica 5:</b> Sestava gojišč za izolacijo bakterij, ki so temeljila na gojišču za mikoplazme (MBB)	26
<b>Preglednica 6:</b> Aerobni izolati iz zadnjega črevesa <i>P. scaber</i> , ter Makromorfološki opis domnevno čistih kultur	35
<b>Preglednica 7:</b> Aerobni izolati iz zadnjega črevesa navadnega prašička <i>P. scaber</i> , gojišče, s katerega so bili izolirani, uvrstitev v taksonomsko kategorijo	38
<b>Preglednica 8:</b> Pigmentiranost kolonij, rezultati barvanja po Gramu, mikromorfološki opis, rast pri temperaturi 37°C ter hemolitična, celulolitična in hitinolitična aktivnost bakterijskih izolatov iz navadnega prašička ( <i>P. scaber</i> )	43
<b>Preglednica 9:</b> Občutljivost za protimikrobne snovi bakterijskih izolatov iz zadnjega črevesa navadnega prašička ( <i>P. scaber</i> )	47
<b>Preglednica 10:</b> Analiza 11239 bp dolgega nukleotidnega zaporedja pHEM	50



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b>	Prebavilo navadnega prašička ( <i>Porcellio scaber</i> )	4
<b>Slika 2:</b>	Fotokromogenost bakterijskih izolatov iz črevesa navadnega prašička ( <i>P. scaber</i> )	42
<b>Slika 3:</b>	Celulazna aktivnost bakterijskih izolatov iz črevesa navadnega prašička ( <i>P. scaber</i> )	45
<b>Slika 4:</b>	Sposobnost razgradnje hitina bakterijskega izolata <i>Stenotrophomonas</i> sp. P4-X3	46
<b>Slika 5:</b>	Plazmidni vektor pUC19 z 11,3 kbp dolgim vključkom kromosomske DNA izolata <i>Stenotrophomonas</i> sp. P7a-A1	48
<b>Slika 6:</b>	Elektroforetska ločitev fragmentov plazmidne DNA klona pHEM po restrikciji z restriktazo <i>PstI</i>	49
<b>Slika 7A:</b>	Predvideni odprti bralni okvirji DNA vključka pHEM	51
<b>Slika 7B :</b>	Shematski prikaz subkloniranja 11,3 kbp DNA fragmenta	51
<b>Slika 8:</b>	Elektroforetska ločitev fragmentov DNA, nastalih po restrikciji z ustreznimi restriktazami oz. pari restriktaz	52
<b>Slika 9:</b>	Hemoliza klonov pHEM in subklonov pTAP ter pLIP na krvnem agarju z Ap	53

## KAZALO PRILOG

- Priloga A1:** Nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA bakterijskih izolatov, ugotovljeno s parom začetnih oligonukleotidov fD1/1392r
- Priloga A2:** Nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA bakterijskih izolatov, ugotovljeno z začetnim oligonukleotidom fD1
- Priloga B:** Nukleotidno zaporedje 11,3 kbp dolgega fragmenta klona pHEM
- Priloga C:** Plazmidni vektor pUC19

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>Ap</b>	antibiotik ampicilin
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>bp</b>	bazni par
<b>CH</b>	hitin ( <i>angl.</i> chitin)
<b>CIP</b>	antibiotik ciprofloksacin
<b>CMC</b>	karboksimetil celuloza ( <i>angl.</i> carboxymethylcellulose)
<b>CTAB</b>	heksadeciltrimetilamonijev bromid
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina ( <i>angl.</i> deoxyribonucleic acid)
<b>E</b>	antibiotik eritromicin
<b>EDTA</b>	etilendiaminotetraoetna kislina ( <i>angl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>EtBr</b>	etidijev bromid
<b>EtOH</b>	etanol
<b>KA</b>	krvni agar
<b>KS</b>	konjski serum
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MBB</b>	gojišče za mikoplazme ( <i>angl.</i> mycoplasma broth base)
<b>MBB+J</b>	gojišče za mikoplazme z jajcem
<b>MH</b>	Mueller-Hinton
<b>NCBI</b>	National Centre for Biotechnology Information
<i>orf</i>	odprti bralni okvir ( <i>angl.</i> open reading frame)
<b>P</b>	antibiotik penicilin
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo ( <i>angl.</i> polymerase chain reaction)
<b>RA</b>	antibiotik rifampin
<b>RDP II.10</b>	Ribosomal Database Project II, Release 10
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina ( <i>angl.</i> ribonucleic acid)
<b>rRNA</b>	ribosomska RNA ( <i>angl.</i> ribosomal RNA)
<b>S</b>	antibiotik streptomycin
<b>SDS</b>	natrijev dodecil sulfat ( <i>angl.</i> sodium dodecylsulphate)
<b>TBE</b>	tris-borat-EDTA
<b>TE</b>	tris-EDTA

<b>Tris</b>	tris(hidroksimetil)-aminometan
<b>TMP</b>	antibiotik trimetoprim
<b>UV</b>	ultravijolična svetloba
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid

## 1 UVOD

Kopenski raki enakonožci, med njimi tudi navadni prašiček (*Porcellio scaber*) so pogosti in splošno razširjeni predstavniki talne makrofavne, katerih osnovna biologija je dobro poznana. V zmernih klimatih so pogosto dominantna komponenta združbe primarnih razkrojevalcev in imajo pomembno vlogo pri razgradnji rastlinskega materiala in kroženju snovi.

Kopenski raki enakonožci so rastlinojedi in se večinoma prehranjujejo z odmrliimi organskimi snovmi rastlinskega izvora, ki so bogate s celulozo in drugimi težko razgradljivimi polisaharidi. Za razliko od termitov in ščurkov, kjer avtohtoni simbiotski mikroorganizmi omogočajo razkroj lignoceluloze, cevasto prebavilo kopenskih enakonožcev nima predelov, kjer bi se hrana zadrževala dalj časa. Zato nekateri avtorji domnevajo, da v prebavilu navadnih prašičkov ne živi simbiotska avtohtona mikrobiota. Hepatopankreas je edini del prebavila, ki ga kopenski raki enakonožci ne levijo in je zato primerno mesto za razvoj mikrobne združbe, ki bi lahko s svojo celulolitično aktivnostjo pomembno prispevala pri razgradnji strukturnih polisaharidov.

Pozornost raziskovalcev so pritegnile paličaste bakterije v papilatni regiji, ki so s konci pritrjene na kutikularne trne stene zadnjega črevesa. Z molekularnim pristopom so avtorji ugotovili, da le-te tvorijo samostojno skupino v redu *Mycoplasmatales*. Zaradi njihovih morfoloških značilnosti in filogenetske pozicije je bilo zanje predlagano ime '*Candidatus Bacilloplasma*' (Kostanjšek in sod., 2007).

Ker razen filogenetsko taksonomskih in morfoloških podatkov o omenjenih mikoplazmah ne vemo ničesar, smo nameravali v tej nalogi s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami, ki temeljijo na osamitvi in gojenju mikroorganizmov, ter uporabo različnih bogatitvenih gojišč, iz zadnjega črevesa kopenskega raka enakonožca izolirati paličaste mikoplazme in jih fenotipsko in genotipsko preučiti.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NAVADNI PRAŠIČEK (*Porcellio scaber*)

Enakonožci (*Isopoda*) sodijo med ekološko najpestrejšše skupine rakov in so razširjeni po vsem svetu. Znanih je več kot 10000 vrst, med katerimi jih večina živi v morju in celinskih vodah. Več kot tretjina vrst - približno 3500 - je uspešno poselila kopensko okolje (zbral Ramel, 2010). Ti spadajo v skupino t.i. kopenskih enakonožcev (*Isopoda*, *Oniscidea*), kamor sodi tudi zelo razširjena in najbolj znana med sinatropnimi vrstami, t.j. navadni oz. kletni prašiček (*Porcellio scaber*). Čeprav poseljuje različne biotope, je njegovo življenjsko okolje pogosto vezano na bližino človeških bivališč, zato ga človek nehotе razširja po celem svetu. Veliko jih živi v tleh, zlasti v gozdni stelji, kjer imajo pomembno vlogo pri predelavi odpadlega listja v humus (Sket in sod., 2003).

Značilno zanj je široko in nekoliko plosko telo brez koša, s sedmimi pari paličastih nog hodilk in listastimi zadkovimi nožicami, ki služijo kot dihalo. Telo navadnih prašičkov je izrazito obokano z navzdol upognjenimi bočnimi ploščami, epimerami, ki prekrivajo tudi noge. Obokana telesna oblika zmanjša izhlapevanje vode skozi kožo in preprečuje izsušitev telesa (Sket in sod., 2003).

Kopenski enakonožci so rastlinojedi in se večinoma prehranjujejo z odmrliimi rastlinami, glivami in algami, obenem pa aktivno in učinkovito sodelujejo pri razgrajevanju organskih snovi, zato so pomembni v procesu kroženja energije in organskih snovi v kopenskih okoljih (Hopkin, 1991; Zimmer in Topp, 1997). Zaradi pomembne vloge v ekosistemu, pa tudi zaradi njihove sposobnosti preživetja v onesnaženih okoljih, so strokovnjaki precejšnji delež raziskav namenili prav njim. Vrste, kot sta navadni prašiček (*Porcellio scaber*) in pozidni prašiček (*Oniscus asellus*), sodijo med najbolj raziskane organizme v kopenski ekofiziologiji in ekotoksikologiji (Hopkin, 1989; Drobne, 1997) (povzeto po Kostanjšek in sod., 2006).

Njihove prehranjevalne navade so raznolike, tako med kopenskimi enakonožci najdemo tudi koprofage, občasno pa naletimo tudi na kanibalizem (Carefoot, 1993; Slavecz in Maiorana, 1998) (povzeto po Kostanjšek in sod., 2006)

Vloga izopodov kot organizmov, ki učinkovito razgrajujejo organske snovi, je v kopenskih okoljih predvsem posredna. Z mehanskim drobljenjem rastlinskih ostankov povečujejo aktivno površino za poselitev mikrobov. Z izbrano hrano v telo pridobijo nove mikroorganizme, s čimer se poveča število le-teh v njihovih prebavilih, sodelujejo pa tudi pri razporeditvi mikroorganizmov v kopenskem ekosistemu (Hanlon 1981a; Hassall in sod, 1987; Neuhauser in Hartenstein 1978; Gunnarsson in sod. 1988; van Wensem in sod 1993). Zaužite mikroorganizme koristno izrabljajo kot vir hranljivih snovi, encimov in vitaminov (Neuhauser in sod, 1974; Hassall in Jennings, 1975; Neuhauser in Hartenstein, 1976; Kozlovskaja in Striganova, 1977; Kaplan in Hartenstein, 1978; Carefoot, 1984; Gunnarsson in Tunlid, 1986; Kukor in Martin, 1986; Ullrich in sod., 1991) (povzeto po Kostanjšek in sod., 2006).

## 2.2 ZGRADBA PREBAVILA IN PREBAVA *P. scaber*

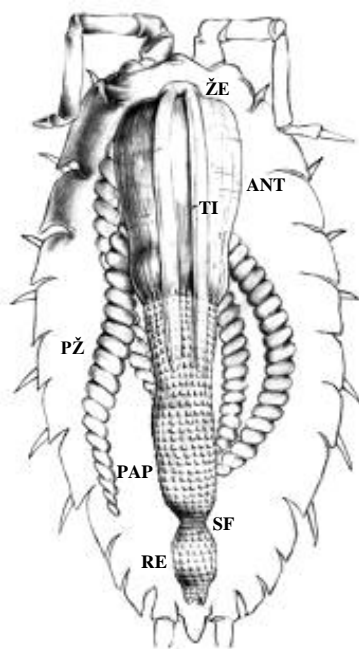
Tridelni prebavni sistem kopenskih enakonožcev (**Slika 1**) sestavljajo kratko sprednje črevo (*stomodeum*), ki obsega požiralnik (*oesophagus*) in mišičasti želodec (*proventriculus*), endodermalno srednje črevo, katerega glavni del predstavlja prebavne žleze (*hepatopancreas*), ter cevasto zadnje črevo (*proktodeum*), ki zavzema skoraj 90% dolžine črevesa. Slednjemu pripadata dva anatomsko in funkcijsko različna dela; sprednji del ali anteriorna regija ter srednji del oziroma papilatna regija, ki se zaključuje s sfinktom, za katerim leži kratek rektum z anusom (Hopkin in Martin, 1984). Dorzalno v anteriorni regiji črevesa poteka vzdolžni tiflosolis, sestavljen iz osrednje gube in dveh lateralnih kanalov. Tiflosolis je anteriorno povezan z želodcem, posteriorno pa sega do papilatne regije (Hames in Hopkin, 1989). Hepatopankreas je sestavljen iz dveh parov zaprtih cevi, ki ležita ob zadnjem črevesu in se odpirata v želodec. Prebavne žleze potekajo ob črevesu in se slepo končajo na distalnem delu. Sprednje in zadnje črevo sta prekrita s kutikulo, ki jo živali pogosto levijo (povzeto po Kostanjšek, 2002).

Glavni del prebave poteka v anteriorni regiji, v katero vstopa predhodno mehansko obdelana hrana prepojena z encimi. Prebavljena hrana potuje iz anteriorne regije po tiflosolisu nazaj v želodec, od tam pa v srednje črevo, kjer se absorbira. Neprebavljena hrana nadaljuje pot skozi papilatno regijo (kjer poteka absorbcija vode, ionov in ostankov

hranil) do rektuma kjer se oblikujejo iztrebki, ki jih žival izloči skozi anus (povzeto po Kostanjšek in sod, 2000).

Morfološke značilnosti prebavila enakonožcev ter prisotnost zračnih mehurčkov, ki so ujeti med delce hrane, kažejo na aerobno okolje v prebavilu. Molekularne študije strukture mikrobne združbe v prebavnem traktu *P. scaber*, t.j. pomnoževanje, kloniranje, sekvenciranje in analiza bakterijskih genov za 16S rRNA pa so potrdila prisotnost tudi anaerobnih bakterij v črevesu (Kostanjšek in sod., 2002).

Posebnost prebavila kopenskih enakonožcev je vzdrževanje podobnih kemijskih razmer v različnih delih prebavila. Stopnje pH vrednosti nihajo od kislosti v žlezah srednjega črevesa in anteriorne regije do rahle kislosti v papilatni regiji. Te majhne razlike v vrednostih pH pa omogočajo delovanje prebavnih encimov tudi v pankreasu in papilatni regiji (Zimmer in Topp, 2002). Kopenski izopodi proizvajajo prebavne sokove v hepatopankreasu, ki je osrednji organ presnove in opravlja funkcije absorpcije, skladiščenja in izločanja (Zimmer, 2002).



**Slika1:** Prebavilo navadnega prašička (*P. scaber*) (ŽE...želodec; ANT... anteriorna regija; TI... tiflozolis; PŽ... prebavne žleze; PAP...papilatna regija; SF... sfinkter; RE...rektum) (povzeto po Kostanjšek in sod., 2006)



## 2.3 MIKROORGANIZMI V PREBAVILIH KOPENSKIH ENAKONOŽCEV

Kot pri ostalih členonožcih je tudi pri kopenskih izopodih sprednje črevo bolj redko poseljeno z mikroorganizmi. Povsem drugače je z mikrobioto v cevastem zadnjem črevesu, ki je zelo bogata in raznolika, še posebno v predelu papilatne regije (Bignell 1984; Drobne 1995; Kostanjšek in sod. 2003). Kopenski izopodi raje izbirajo v snovi, ki so bogato poseljene z mikroorganizmi (Soma in Saito 1983; Gunnarsson 1987; Zimmer in sod. 1996). Del zaužitih mikroorganizmov, predvsem gliv in po Gramu negativnih bakterij, se prebavi že med potjo čez prebavni sistem (Reyes in Tiedje 1976b; Coughtrey in sod 1980; Hanlon in Anderson 1980; Hanlon 1981b; Gunnarsson in Tunlid 1986; Clegg in sod 1994, 1996; Kayang in sod 1994; Zimmer in Topp 1998b; Kostanjšek 2002)., ugodne razmere v zadnjem črevesu pa omogočijo razmnoževanje bakterij.

**Preglednica 1:** Bakterije v prebavilu kopenskih rakov enakonožcev (povzeto po Kostanjšek in sod., 2006)  
**Preglednica 1** se nadaljuje na naslednji strani.

Bakterija	Č	ŽS	I	Vrsta enakonožca	Vir
<i>Aeromonas</i> sp.	-	+	-	<i>Porcellio scaber</i>	Ullrich in sod. (1993)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	-	-	-	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Arthrobacter</i> sp.	+	-	+	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Azotobacter agilis</i>	+	-	-	<i>Oniscus asellus</i>	Beerstecher in sod. (1954)
<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2002)
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Jorgensen in sod. (1997)
				<i>Porcellio scaber</i>	Margulis in sod. (1998)
<i>Bacteroides</i> sp.	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2002)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-	-	+	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1993)
				<i>Porcellio scaber</i>	Ullrich in sod. (1993)
Corynebacteriaceae	+	-	+	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Corynebacterium</i> sp.	+	-	-	<i>Oniscus asellus</i>	Ineson in Anderson (1985)
<i>Cytophaga</i> sp.	-	-	+	<i>Oniscus asellus</i>	Hassall in sod. (1987)
				<i>Porcellio scaber</i>	Hassall in sod. (1987)
				<i>Armadillidium vulgare</i>	Hassall in sod. (1987)
<i>Desulphotomaculum ruminis</i>	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Lapanje in sod. (2003); Kostanjšek in sod. (2004a)
Enterobacteriaceae		+	-	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	+		-	<i>Oniscus asellus</i>	Griffiths in Wood (1985)
				<i>Porcellio scaber</i>	Ullrich in sod. (1993)
<i>Enterobacter intermedium</i>	-	+	-	<i>Porcellio scaber</i>	Ullrich in sod. (1993)
<i>Enterococcus faecium</i>	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2002)
<i>Enterococcus</i> sp.	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2002)
<i>Flavobacterium</i> sp.	+	-	+	<i>Tracheoniscus rathkei</i>	Reyes in Tidje (1976)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+		+	<i>Oniscus asellus</i>	Ineson in Anderson (1985)
				<i>Porcellio scaber</i>	Ullrich in sod. (1993)
Micrococcaceae	+	-	-	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)

Bakterija	Č	ŽS	I	Vrsta enakonožca	Vir
<i>Mollicutes</i>	+	+	+	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek (2002); Kostanjšek in sod. (2004a)
<i>Mycobacteriaceae</i>	-	-	+	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Neisseria</i> sp.	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2002)
<i>Paracoccus</i> sp.	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2006)
<i>Plesiomonas</i>	+	-	-	<i>Oniscus asellus</i>	Griffiths in Wood (1985)
<i>Pseudomonadaceae</i>	+	-	+	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	-	<i>Oniscus asellus</i>	Griffiths in Wood (1985)
<i>Pseudomonas</i> sp.	+		-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2002)
	+			<i>Tracheoniscus rathkei</i>	Reyes in Tidje (1976a)
		+		<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek (2002)
<i>Rhabdochlamydia porcellionis</i>		+		<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2004b)
<i>Shevanella</i> sp.	+	-	-	<i>Porcellio scaber</i>	Kostanjšek in sod. (2006)
<i>Spirilaceae</i>	-	-	+	<i>Oniscus asellus</i>	Ullrich in sod. (1991)
<i>Streptomyces humidus</i>	-	-	+	<i>Protracheoniscus amoneus</i>	Márialigeti in sod. (1984)
<i>Streptomyces moderatus</i>	-	-	+	<i>Protracheoniscus amoneus</i>	Márialigeti in sod. (1984)
<i>Streptomyces nodosus</i>	-	-	+	<i>Protracheoniscus amoneus</i>	Márialigeti in sod. (1984)
<i>Streptomyces pluricoloescens</i>	-	-	+	<i>Protracheoniscus amoneus</i>	Márialigeti in sod. (1984)
<i>Streptomyces spadicis</i>	-	-	+	<i>Protracheoniscus amoneus</i>	Márialigeti in sod. (1984)

Č... črevo, ŽS...žleze srednjega črevesa, I...iztrebki;

### 2.3.1 Bakterije v prebavilih

Čeprav nekateri raziskovalci menijo, da večino bakterij v prebavilih navadnega prašička predstavljajo predvsem tiste bakterije, ki jih žival zaužije s hrano, ostaja dejstvo, da so v teh živalih, kot je to značilno tudi za druge, ki se hranijo z lignocelulozo, naseljene tudi indigene in/ali avtohtone bakterije. Prebavila kopenskih enakonožcev se zaradi nekaterih lastnosti, kot so preprosta anatomija prebavil, pogosto obnavljanje povrhnjice in kratek čas zadrževanja hrane v telesu, zdijo na prvi pogled precej neprimerno okolje za razvoj takšnih, avtohtonih mikroorganizmov (Hassall in Jennings, 1975). Toda nekatera poročila, ki slonijo na tradicionalnih mikrobioloških metodah (Reyes in Tidje, 1976a; Griffiths in Wood, 1985; Ineson and Anderson, 1985; Gunnarsson in Tunlid, 1986; Hassall in sod., 1987; Ullrich in sod., 1991), predvsem pa tista, ki temeljijo na molekularnih pristopih, ki ne vključujejo izolacije in gojenja mikroorganizmov (Kostanjšek in sod., 2002a, 2004b, 2007), kažejo, da v prebavnem traktu navadnega prašička vendarle živijo pravi indigeni in avtohtoni mikroorganizmi, tako kot v prebavilih drugih živali, ki se hranijo pretežno s t.i.

lignoceluloznim kompleksom. Pri vrsti *P. scaber* so, pritrjene na povrhnjico papilatne regije v zadnjem črevesu, opazili dolge, paličaste bakterije (Drobne 1995; Kostanjšek in sod. 2003). S filogenetsko analizo sekvenc genov za 16S rRNA, so ugotovili, da te bakterije tvorijo samostojno filogenetsko skupino '*Candidatus Bacilloplasma*' sodijo v red znotraj bakterijskega razreda *Mollicutes* (Kostanjšek in sod., 2007). Preučevanje strukture je razkrilo prisotnost kroglaste strukture na konici te bakterije, ki ji služi za pritrditev na povrhnjico v prebavilu. Razvoj tovrstne strukture je verjetno posledica prilagoditve okolju, zato bi lahko ta bakterija predstavljala pravo avtohtono črevesno bakterijo vrste *P. scaber* (Kostanjšek in sod., 2003).

Prisotnost te črevesne bakterije, ki je sicer ni mogoče najti v zemlji ali hrani (Kostanjšek, 2002), nakazuje tudi druge možnosti bakterijske kolonizacije prebavnega sistema navadnega prašička (ne le prek zaužitja snovi). Paličasto bakterijo so opazili tudi na novo oblikovani kutikuli v zadnjem črevesu, ko je bilo le-to še obloženo s staro, nedotaknjeno povrhnjico (Kostanjšek, 2002). Bakterija se lahko obdrži v prebavilu med levitvijo, kar ji omogoča preživetje in nastanitev na novi črevesni povrhnjici že zelo kmalu po njenem nastanku. Tako koprofagija in zaužitje stare povrhnjice zadnjega dela prebavila morda nista edina načina vnovičnega poseljevanja bakterij po levitvi.

Kljub predvidevanjem, da je okolje v zadnjem črevesu večinoma aerobno, bi lahko zaradi velike količine mukopolisaharidov na površini črevesa, nastale tudi tako imenovane mikroniše oziroma mikrookolja, primerna za razvoj anaerobnih bakterij. Ti biopolimeri namreč upočasnjujejo difuzijo kisika in obenem nudijo dodatno površino za pritrditev bakterij (Hartenstein, 1964; Savage, 1978). Sicer obstaja nekaj zapisov o neuspešnih poskusih izolacije in gojenja črevesnih mikrobov pri izopodih v anaerobnih razmerah (Reyes in Tiedje, 1976a; Ullrich in sod., 1991), a so prisotnost anaerobne bakterije, ki sodeluje pri metilaciji živega srebra v prebavnem traktu navadnega prašička opisali Jereb in sodelavci (2003).

Metilacija živega srebra je eden izmed stranskih učinkov metabolnega procesa sulfat reducirajočih bakterij (v nadaljevanju SRB); pri tem se več kot 95% razpoložljivega živega srebra pretvori v tako imenovano metil živo srebro, ki je izjemno strupeno (Compeau in

Bartha, 1984, 1985; Pak in Bartha, 1998a, b). S filogenetsko analizo sekvence gena za 16S rRNA so prvo anaerobno bakterijo, opaženo v prebavnem sistemu kopenskega enakonožca, identificirali kot *Desulfotomaculum ruminis* (Lapanje in sod. 2003). Možnosti obstoja anaerobnih mikroniš v zadnjem črevesu izopodov tako ne gre zanemariti, saj jih nakazujeta tako prisotnost anaerobnih SRB (Lapanje in sod. 2003) kot tudi odkritje ribosomskih genov drugih anaerobnih bakterij na povrhnjici v zadnjem delu prebavila, kjer je okolje verjetno res pretežno aerobno, saj se kisik dovaja v obrobni obroč zadnjega črevesa neposredno iz hemolimfe skozi povrhnjico (Kostanjšek in sod., 2002a).

### 2.3.2 Mikroorganizmi v prebavnih žlezah

Mikrobom, ki iz želodca potujejo v smeri prebavnih žlez, naj bi vstop v le-te onemogočil sistem hitinastih filtrov (Hames in Hopkin, 1989; Storch in Štrus, 1989), ki prepušča zgolj tekočine in delce, manjše od 40 nm (Hames in Hopkin 1989). Vendar pa so pri vrstah *Porcellio dilatatus* (Donadey in Besse, 1972), *O. asellus* (Hopkin in Martin, 1982; Wood in Griffiths, 1988; Hames in Hopkin, 1989, 1991; Ullrich in sod., 1991; Clegg in sod., 1996), *P. scaber* (Wood in Griffiths 1988; Hames in Hopkin 1989, 1991; Ullrich in sod., 1991; Zimmer in Topp, 1998a, b; Kostanjšek, 2002) in *L. pallasii* (Zimmer in sod., 2001) (**Preglednica 1**) kljub temu opazili prisotnost bakterij v lumnu prebavnih žlez. Med njimi so bile paličaste hepatopankreatske bakterije pri *P. scaber* in *O. asellus*, ki jih opisujeta Wood in Griffiths (1988), morfološko dokaj podobne paličastim mikoplazmam, ki se pritrjajo na kutikularne trne povrhnjice v zadnjem črevesu pri *P. scaber* (Kostanjšek, 2002). Poleg tega so na apikalno površino epitelnih celic opazili pritrjene žlez srednjega črevesa pri *L. italica*, *T. albus* in *P. scaber* opazili tudi spirohete.

## 2.4 NOVI NAČINI IZOLACIJE MIKROORGANIZMOV IZ OKOLJA

V zadnjih letih so mikrobiologi ponovno obudili zanimanje za izolacijo in gojenje novih, še nepoznanih mikrobov iz najrazličnejših okolij. Intenzivno so pričeli razvijati nove metode, ki omogočajo izolacijo bistveno večjega števila mikrobnih vrst iz naravnih okolij kot doslej. Temu je botrovalo spoznanje o izjemni pestrosti (zaenkrat predvsem taksonomski) mikroorganizmov, ki naseljujejo različne ekosisteme, ki so jo raziskovalci

zaznali s t.i. metagenomskimi študijami (Rappe in Giovannoni, 2002). Izkazalo se je tudi, da večina doslej gojenih mikroorganizmov v okoljih, iz katerih so jih izolirali, predstavlja le manjšinjsko populacijo, t.i. redko biosfero (Pedros-Alio, 2006). Zato so nujno potrebni novi pristopi, metode in gojišča, ki bodo omogočili izolacijo in gojenje tudi tistih mikroorganizmov, ki v lastnih okoljih predstavljajo dominantne populacije, ki so vsaj na prvi pogled zelo verjetno tudi najbolj pomembne za delovanje celotnega ekosistema. Nove metode temeljijo na novih gojiščih, primerni pripravi vzorcev s t.i. redčenjem do izginotja (Connon in Giovannoni, 2001), omogočanju kroženja metabolitov in signalnih komunikacijskih molekul ob sočasnem preprečevanju neposrednega fizičnega stika mikrobnih celic različnih vrst (Keberlein in sod. 2002, Zangler in sod., 2002), ter nenazadnje na modernih molekularnih postopkih, ki omogočajo hitro in zanesljivo identifikacijo izolatov, brez potrebe po pridobitvi večjih količin mikrobne biomase (Amann in sod., 1995).

Tudi v naši diplomski nalogi smo zato nameravali uporabiti nekatere od omenjenih pristopov, predvsem večje število redčenih gojišč in hitro identifikacijo zraslih kultur s sekvenciranjem in analizo genov za 16S rRNA.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Poskusne živali (*Porcellio scaber* Latreille, 1804) smo gojili v steklenih terarijih na Katedri za zoologijo, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete pri temperaturi 22-23°C in visoki vlažnosti, ki smo jo vzdrževali s škropljenjem z destilirano vodo ter izmenjavi dnevno-nočnega cikla v razmerju dan/noč = 16/18 ur. Živali smo hranili z listno steljo, nabrano na nekontaminiranih lokalitetah v okolici Ljubljane. V poskusu je bilo žrtvovanih sedem odraslih zdravih samcev, težkih med 40 in 80 mg v medlevitveni fazi. Spol in levitveno fazo živali je določil doc.dr. Rok Kostanjšek.

#### 3.2 IZOLACIJA BAKTERIJ IN GOJENJE ČISTIH KULTUR

Za izolacijo mikroorganizmov iz zadnjega črevesa navadnega prašička smo uporabili štiri različna agarizirana gojišča, ki so temeljila na gojišču za mikoplazme (MBB, *angl.* Mycoplasma Broth Base). V dveh primerih smo osnovnemu gojišču po sterilizaciji dodali humani serum oz. bogatitev s konjskim serumom, v enem primeru pa ubito kokošje jajce.

Priprava preparatov in vzorcev zadnjega črevesa poskusnih živali je potekala na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, ki jo je opravil doc. dr. Rok Kostanjšek.

Poskusne živali smo uspavali z etrom. Zadnje črevo petih rakov smo izvlekli s sterilno pinceto skozi zadnji del živali in ga aseptično prenesli v tekoče gojišče Z<sub>j</sub>. Črevo smo s sterilno volframovo iglo odprli po dolžini, odstranili sfinkter in rektum ter notranjo površino črevesa sprali s gojiščem Z<sub>j</sub>. Tkivo smo prenesli na objektno steklo (Tlos, Zagreb), očiščeno s 96-odstotnim etanolom, ga pokrili s krovnim stekelcem (Tlos, Zagreb) in opazovali s fazno kontrastnim mikroskopom (BX 50; Olympus Optical Co., Japonska in Zeiss NU 2, Nemčija). Iskali smo paličaste bakterije, pritrjene na kutikularne trne stene zadnjega črevesa, kot je to opisal Kostanjšek (2002).

Po mikroskopiranju smo z objektnega stekla previdno odstranili krovno stekelce, na katerega smo nanесли 20 µl tekočega gojišča Z<sub>j</sub>, narahlo premešali in mešanico s spatulo po

Drigalskem enakomerno razmazali na površino gojišča z jajcem (MBB+J). Vzorce P1-P5 smo pripravili tako, da smo na objektno steklo kanili 160  $\mu$ l tekočega gojišča  $Z_j$  in narahlo premešali. 15  $\mu$ l mešanice z objektnega stekla s črevesom, kjer smo opazili veliko pritrjenih paličastih bakterij (označili smo ga z zaporedno številko 4), smo nanесли na plošče z gojiščem B, C, E, F, W, X, Y, S, R in J v petrijevkah. Z ostalih objektnih stekel smo nanесли po 20  $\mu$ l mešanice na različna agarizirana gojišča, kot prikazuje **Preglednica 2**.

Vzorca P6 in P7 smo pripravili tako, da smo s sterilno pinceto aseptično prenesli odstranjeno črevo v 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko (Eppendorf, Nemčija). Dodali smo 200  $\mu$ l sterilnega tekočega gojišča  $Z_j$ , mešali z vibracijskim mešalom (EV-100; Tehnica Železniki) 2 minuti in pustili, da se črevo in večji delci samodejno posedejo. Za gojenje mikroorganizmov smo uporabili suspenzijo in posedeni material. Na agarizirano gojišče W in Z v petrijevkah smo nacepili 80  $\mu$ l suspenzije šestega vzorca (P6a), črevo (P6b) pa smo s sterilno cepilno zanko nanесли po celotni površini gojišča Z. 80  $\mu$ l suspenzije sedmega vzorca (P7a) smo s spatulo po Drigalskem razmazali na plošče A in B, črevo (P7b) pa le na gojišče B. Sestava in priprava gojišč je prikazana v podpoglavju 3.9.1.

**Preglednica 2:** Gojišča, ki smo jih uporabili za izolacijo bakterij iz različnih vzorcev zadnjega črevesa sedmih kopenskih rakov enakonožcev *Porcellio scaber*

Vzorec	Gojišče														
	A	B	C	D	E	F	Z	W	X	Y	V	T	S	R	J <sup>a</sup>
P1	•	•		•		•	•	•		•		•		•	
P2		•		•		•		•	•		•		•		•
P3	•		•		•		•		•		•		•		•
P4		•	•		•	•		•	•	•			•	•	•
P5	•		•		•		•		•		•	•	•		
P6a							•	•							
P6b							•								
P7a	•	•													
P7b		•													

J<sup>a</sup>...gojišče MBB+J

P1-P5...mikroskopski preparati zadnjega črevesa petih rakov, pomešanih s tekočim gojiščem  $Z_j$

P6a, P7a...suspenzija nad črevesom

P6b, P7b...črevo

Plošče smo oblepili z zaščitnim filmom (Parafilm "M", Pechiney Plastic Packaging Company, ZDA), jih inkubirali v aerobnih pogojih pri temperaturi 22°C in jih pregledovali nekajkrat tedensko 2 meseca. Poljubno izbrane, makromorfološko zanimive zrasle kolonije smo popisali in precepili na istovrstno gojišče.

Kulture mikroorganizmov smo preverjali s pregledovanjem plošč in medsebojnim primerjanjem kolonij, mikromorfološko pa z barvanjem po Gramu in opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom (Option, Zahodna Nemčija). Čiste kulture smo shranjevali s subkultiviranjem na trdnem gojišču po Lurii in Bertaniju (LB) in jih precepljali na 21 dni. Devetnajst morfološko različnih ali/in domnevno najbolj pogosto zastopanih bakterijskih izolatov smo identificirali z molekularno biološkimi metodami in jih nadalje fenotipsko opredelili.

### 3.3 FENOTIPSKA OPREDELITEV BAKTERIJSKIH IZOLATOV

#### 3.3.1 Barvanje po Gramu

Posušen in nad plamenom plinskega gorilnika fiksiran razmaz sveže bakterijske kulture na objektnem steklu smo 30 sekund barvali z raztopino kristal vijoličnega (Sigma). Barvilo smo sprali z rahlim curkom destilirane vode in preparat prelili z lugolovo raztopino (Merck). Pustili smo 1 minuto, sprali z rahlim curkom destilirane vode in razbarvali s 96-odstotnim etanolom (Merck). Po ponovnem spiranju z destilirano vodo smo preparat odcedili in prelili z raztopino safranina. Barvali smo 30 sekund, nato sprali z destilirano vodo in posušili. Preparat smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom (Option, Zahodna Nemčija) pri 1000-kratni povečavi (imerzijski objektiv).

#### 3.3.2 Rast pri temperaturi 37°C

Čiste bakterijske kulture smo aseptično cepili na svežo ploščo gojišča po Lurii in Bertaniju (LB) (priprava gojišča je prikazana v podpoglavju 3.9.1) in inkubirali 3-7 dni pri temperaturi 37°C. Da bi preprečili izsušitev gojišč, smo plošče oblepili z zaščitnim filmom in jih (med inkubacijo) hranili v plastičnih vrečkah. Po inkubaciji smo cepljena gojišča pregledali in označili rast.



### 3.3.3 Fotokromogenost

Bakterijske izolate smo s sterilno cepilno zanko cepili na 2 sveži plošči gojišča po LB. Plošči smo inkubirali v različnih svetlobnih razmerah; v prvem primeru smo ploščo inkubirali na svetlobi, v drugem primeru pa v temi (ploščo smo popolnoma prekrili z aluminijasto folijo). Po končani inkubaciji (3-7 dni, 22°C) smo aluminijasto folijo odstranili in primerjali barvo kolonij bakterijskih izolatov.

### 3.3.4 Hemolitična aktivnost

Bakterijske kulture smo s sterilno cepilno zanko cepili do posameznih kolonij na plošče krvnega agarja (KA) (priprava gojišča je prikazana v podpoglavju 3.9.1), jih inkubirali 3-7 dni pri temperaturi 22°C in opazovali pojav lize eritrocitov okoli posameznih kolonij bakterijskih izolatov.

### 3.3.5 Celulolitična in hitinolitična aktivnost

Čiste bakterijske kulture smo s sterilnim zobotrebcom točkovno nanесли na gojišče s karboksimetilcelulozo (CMC, *angl.* carboxymethylcellulose) (sestava in priprava gojišč sta prikazani v podpoglavju 3.9.1) in plošče oblepili z zaščitnim filmom. Po končani inkubaciji pri temperaturi 22°C 10-14 dni smo površino plošč prelili z raztopino kongo rdečega barvila (1 mg/ml) in pustili stati 15 minut. Nato smo barvilo odlili in plošče prelili z 1 M NaCl za 15 minut (Teather in Wood, 1982). Pojav neobarvanih območij okoli posameznih kolonij bakterijskih izolatov je potrdil celulazno produkcijo.

Za ugotavljanje hitinolitične aktivnosti smo bakterijske izolate s sterilnim zobotrebcom aseptično nanесли na modificirano gojišče s hitinom (CH, *angl.* chitin) (Popavath in sod., 2008) (sestava in priprava gojišč sta prikazani v podpoglavju 3.9.1). Plošče smo oblepili z zaščitnim filmom. Med 14-dnevno inkubacijo pri temperaturi 22°C smo plošče pregledovali in iskali pojav zbistritvenih con okoli bakterijskih kolonij v sicer motnem gojišču (cona zbistritve je pomenila prisotnost hitinaz).

Pri nanosu bakterij na gojišča s CMC oz. CH smo pazili, da skupaj s kulturo nismo prenesli še izhodnega gojišča.

### 3.3.6 Občutljivost za protimikrobne snovi

Občutljivost bakterijskih izolatov za protimikrobne snovi smo ugotavljali z metodo difuzijskega antibiograma. Na plošče z gojiščem po Mueller-Hinton-u (MH) (priprava gojišča je prikazana v podpoglavju 3.9.1) smo z vatenko nanesli v fiziološki raztopini resuspendirano svežo kulturo preiskovanega seva. Inokulum smo cepili po vsej površini plošče iz treh smeri pod kotom 60°. Na osušeno površino gojišča smo s sterilno pinceto v primerni medsebojni oddaljenosti položili diske z antibiotiki: rifampin 15 µg (RA-15), ciprofloxacim 5 µg (CIP-5), trimetoprim 5 µg (TMP-5), eritromicin 2 µg (E-2), streptomycin 10 µg (S-10), ampicilin 10 µg (AM-10) in penicilin 10 U (P-10) (vse BBL<sup>®</sup>; Becton Dickinson and Company, ZDA). Po inkubaciji 3-5 dni pri temperaturi 22°C smo odčitali inhibicijske cone in po navodilih proizvajalca (BBL<sup>™</sup> Sensi-Disc<sup>™</sup> Zone Interpretation Set) poskušali ugotoviti, ali je sev odporen, intermediaren ali občutljiv za preizkušani antibiotik.

## 3.4 IZOLACIJA KROMOSOMSKE DNA

Izolacijo kromosomske DNA iz bakterijskih izolatov smo izvedli s kompletom Genomic DNA Purification Kit (Fermentas Life Sciences). Pri postopku izolacije smo sledili navodilom proizvajalca, ki smo jih nekoliko priredili.

Izhodiščni material je bila sveža bakterijska kultura, ki je zrasla na trdnem gojišču po LB. Kulturo smo s sterilno cepilno zanko postrgali s plošče in resuspendirali v 200 µl pufru TE (pH 8,0). Dodali smo 400 µl raztopine za lizo celic, premešali in inkubirali 5 minut pri temperaturi 65°C. Bakterijskemu lizatu smo dodali 600 µl kloroforma (Merck), zaprto mikrocentrifugirko nekajkrat nežno obrnili in centrifugirali 10 minut pri 12000 vrt./min in 4°C (centrifuga Beckmann). Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko (Eppendorf, Nemčija) in dodali 800 µl sveže raztopine za obarjanje DNA, ki smo jo pripravili po navodilih proizvajalca. Med dvominutno inkubacijo pri sobni temperaturi smo zaprto mikrocentrifugirko nekajkrat nežno obrnili. Po centrifugiranju v namizni centrifugi

(10000 vrt./min, 2 min, sobna temperatura) (Eppendorf Centrifuge 5417C) in odstranitvi supernatanta smo usedlino resuspendirali v 100  $\mu$ l 1,2 M NaCl. Dodali smo 300  $\mu$ l ohlajenega 96-odstotnega EtOH (Merck) in mešanico inkubirali 3 ure pri temperaturi -20°C. Oborjeno DNA smo centrifugirali (10000 vrt./min, 4 min, sobna temperatura), odlili supernatant in usedlino očistili s 500  $\mu$ l 80-odstotnega ohlajenega EtOH. Ves EtOH smo odstranili, usedlino osušili in resuspendirali v 40  $\mu$ l pufru TE z RNazo. Izolirano DNA smo do nadaljnje uporabe shranili pri temperaturi -20°C.

Pri bakterijskih izolatih P2-W2, P3-Z5, P3-Z6, P4-X3, P4-X6, P4-S3, P5-X1, P6a-Z2, P6a-Z4, P6a-W1, P7a-A1 smo postopek centrifugiranja (12000 vrt./min, 10 min, 4°C) in prenosa zgornje vodne faze v svežo mikrocentrifugirko večkrat ponovili, dokler nismo iz supernatanta odstranili večine nečistoč.

Med izolacijo kromosomske DNA izolatov P3-V1 in P4-X5 smo vodno fazo ob hkratnem merjenju volumna ( $V_{sn}$ ) prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dodali enak volumen ( $1 \times V_{sn}$ ) mešanice kloroform:izoamilalkohol (Merck) v razmerju 24:1. Mikrocentrifugirko smo nekajkrat nežno obrnili in centrifugirali 10 min pri 12000 vrt./min in 4°C. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in nadaljevali po zgoraj opisanem postopku.

### 3.5 POMNOŽEVANJE 16S rDNA V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200-mikrolitrskih mikrocentrifugirkah (MicroAmp, Perkin Elmer). Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 12,5  $\mu$ l izhodiščne zmesi (MasterMix; Fermentas Life Sciences), 1  $\mu$ l (10 pmol) začetnega oligonukleotida (fD1; Jena Bioscience GmbH, Nemčija) in 1  $\mu$ l (10 pmol) začetnega oligonukleotida (1392r; Jena Bioscience GmbH, Nemčija), 1  $\mu$ l matrične DNA (kromosomska DNA bakterijskih izolatov) v TE z RNazo ter 9,5  $\mu$ l sterilne deionizirane vode. Podatki o začetnih oligonukleotidih so prikazani v **Preglednici 3**.

Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, ZDA). Začetnemu 2,5-minutnemu segrevanju reakcijske mešanice pri 95°C je sledilo 30 ciklov pomnoževanja: 30 s pri 94°C (denaturacija), 30 s pri 60°C (prileganje

začetnih oligonukleotidov) in 1,5 minute pri 72°C (podaljševanje verige DNA), tem pa 7-minutna podaljšana polimerizacija pri 72°C.

Prisotnost produkta smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo v 0,8-odstotnem agaroznem gelu v 1×TBE.

**Preglednica 3:** Začetni oligonukleotidi, uporabljeni v PCR in reakcijah ugotavljanja nukleotidnega zaporedja

Tip	Poimenovanje	Zaporedje (5'→3')	Tarčno zaporedje ( <i>E.coli</i> 16S rRNA)	Specifičnost	Vir
F	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCA	8...26	Bakterijski	Weisburg in sod., 1991
R	1392r	ACGGGCGGTGTGTRC	1392...1406	Univerzalni	Olsen in sod., 1986

F...začetni oligonukleotid v smeri 5'→3' kodirajoče verige

R...začetni oligonukleotid v smeri 3'→5' kodirajoče verige

R=A ali G

### 3.6 HORIZONTALNA AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA PRODUKTOV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

Prisotnost, velikost in količino produkta verižne reakcije s polimerazo smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo v 0,8-odstotnem agaroznem gelu v 1×TBE. 0,24 g agaroze (SeaKem® LE Agarose, Cambrex Bioscience Rockland, Inc., ZDA) smo s segrevanjem v mikrovalovni pečici raztopili v 30 ml 1× Tris-boratnega pufra (1×TBE) in ohlajenemu gelu (50°C) dodali etidijev bromid (EtBr; 10 mg/ml) do končne koncentracije 0,5 µg/ml. Gel smo vlili v vpet nosilec z vstavljenim glavnikom za žepke. Ko se je agarozna mešanica pri sobni temperaturi ohladila in polimerizirala, smo glavnik odstranili, gel na nosilcu pa vstavili v posodo za elektroforezo z elektroforeznim pufrom (1×TBE). 5 µl mešanice vzorca in nanašalnega pufra (6×DNA Loading Dye; Fermentas Life Sciences) v razmerju 1:5 smo vnesli v jamice gela. Ob vzorcih smo na vsak gel nanesti velikostni standard, t.j. 1 kb lestvico (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; Fermentas Life Sciences). Elektroforeza je potekala 45 minut pri napetosti 10 V/cm, ki smo jo zagotovili z virom napetosti (2301 Macrodrive 1, LKB Bromma). DNA v gelu smo odkrivali z vzbujanjem EtBr pri valovni dolžini 302 nm in sliko dokumentirali s sistemom UVI-tec Limited (Anglija).

### 3.7 UGOTAVLJANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA GENA OZ. DELA GENA ZA 16S rRNA

Produkte pomnoževanja genov za 16S rRNA s PCR in parom začetnih oligonukleotidov fD1/1392r smo po ločitvi z elektroforezo izrezali iz gela s sterilnim skalpelom (AESCULAP AG & CO.KG, Nemčija), jih očistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) po navodilih proizvajalca in uporabili kot matrico za reakcije ugotavljanja nukleotidnega zaporedja z začetnim oligonukleotidom fD1 (očiščen pomnožek 16S rDNA bakterijskih izolatov P2-S5, P3-Z2, P3-Z5, P3-Z6, P4-X3, P4-X5, P4-X6, P4-S3, P6a-Z3, P6a-Z4, P6a-W1) oz. s parom začetnih oligonukleotidov fD1 in 1392r (očiščen pomnožek bakterijskih izolatov P2-W2, P3-E2, P3-V1, P5-X1, P6a-Z1, P7a-A1, P7a-A4, P7a-A16), ki so jih izvedli po naročilu v podjetju Microsynth (Švica) (<http://www.microsynth.ch>).

Nukleotidna zaporedja gena oz. dela gena za 16S rRNA bakterijskih izolatov smo analizirali z orodjem Sequence Utilities BCM Search Launcher-ja (<http://searchlauncher.bcm.tcm.edu>) (Smith in sod., 1996) ter RDP Classifier (RDP Naïve Bayesian rRNA Classifier Version 2.0, julij 2007) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) (Wang in sod., 2007) in Sequence Match Ribosomal Database Project II, Release 10.19 (RDP II 10.19) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) (Cole in sod., 2009). Z RDP Classifier-jem smo bakterijske izolate umestili v obstoječo hierarhično razporeditev, kot jo predlaga Bergeyev priročnik za sistematsko bakteriologijo.

Z orodjem Sequence Match smo v bazi podatkov poiskali nukleotidna zaporedja sorodnih bakterijskih vrst v zbirki sekvenc 16S rDNA daljših in krajših od 1200 bp, tipskih in netipskih ter gojenih in negojenih mikrobnih sevov, prikazanih v obliki hierarhične razporeditve, kot jo predlaga Bergeyev priročnik za sistematsko bakteriologijo. Iskanje je zajelo sekvence, ki so bile v bazi podatkov 4. aprila 2010; na ta dan je baza obsegala 1 396 793 sekvenc.

### 3.8 GENETSKA OPREDELITEV ZAPISA ZA HEMOLITIČNO AKTIVNOST BAKTERIJSKEGA IZOLATA *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1

#### 3.8.1 Kloniranje

Fragmente kromosomske DNA bakterijskega izolata *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1, nastale po delni restrikciji z restrikcijsko endonukleazo *Pst*I, smo vključili v plazmidni vektor pUC19. Linealizirani plazmid pUC19 je dolg 2686 bp, nosi zapis za odpornost proti ampicilinu in funkcionalen gen *lacZ'*, v katerega je vstavljeno poliklonsko mesto (Priloga C). Transformacija vektorja v bakterijski sev z okvarjenim genom za  $\beta$ -galaktozidazo omogoča ločevanje med rekombinantno in nerekombinantno DNA. Na gojiščih z ampicilinom (Ap) in dodanim X-Galom (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid) so nerekombinantne kolonije obarvane modro, rekombinantne bakterije pa ostanejo neobarvane (t.i. modro-bela selekcija).

#### 3.8.2 Restrikcija plazmidnega vektorja pUC19 in kromosomske DNA

Plazmidno DNA pUC19 smo izolirali iz seva CL247 (genotip je prikazan v podpoglavju 3.10) s kompletom GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Life Sciences) po priporočilih proizvajalca in jo raztopili v 50  $\mu$ l pufra EB (Elution Buffer).

Plazmidni vektor pUC19 in kromosomsko DNA seva *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 smo rezali z restrikcijsko endonukleazo *Pst*I (CTGCA↓G, 10 U/ $\mu$ l; Fermentas Life Sciences). Reakcijski mešanici smo pripravili v 1,5 ml mikrocentrifugirkah (Eppendorf, Nemčija) tako, da smo zmešali 1  $\mu$ l (10 U) *Pst*I, 2  $\mu$ l 10 $\times$ pufra O (oboje Fermentas Life Sciences), 14  $\mu$ l kromosomske DNA seva *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 v TE z RNazo in 3  $\mu$ l sterilne deionizirane vode oz. 5  $\mu$ l plazmidne DNA pUC19 v pufru EB in 12  $\mu$ l sterilne deionizirane vode. Pokrovčke mikrocentrifugirk smo oblepili z zaščitnim filmom. Restrikcijsko mešanico s kromosomsko DNA bakterijskega izolata smo inkubirali 8 min v vodni kopeli pri 37°C, restrikcijsko mešanico s plazmidno DNA pUC19 pa 1 uro. Reakciji smo zaustavili z 20-minutno inkubacijo pri 68°C.

### 3.8.3 Ligacija

Ligacijsko mešanico smo pripravili v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki in je vsebovala: 1  $\mu$ l ligaze T4 (5 U), 4  $\mu$ l 5 $\times$  T4 DNA Ligase Buffer (oboje Fermentas Life Sciences), 13  $\mu$ l z restriktazo *Pst*I delno rezane kromosomske DNA seva *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 in 2  $\mu$ l s *Pst*I popolnoma razrezanega plazmidnega vektorja pUC19. Pokrovček mikrocentrifugirke smo oblepili z zaščitnim filmom in jo inkubirali 1 uro pri 22°C v vodni kopeli. Ligacijsko mešanico smo do uporabe hranili pri 4°C.

### 3.8.4 Priprava kompetentnih celic *E. coli* DH5

Svežo prekonočno bakterijsko kulturo *E. coli* DH5 (genotip je prikazan v podpoglavju 3.10) smo nacepili v 20 ml tekočega gojišča LB, ogretega na 37°C. Kulturo smo inkubirali pri 37°C s stresanjem na rotacijskem stresalniku (300 vrt./min) (New Brunswick Scientific, Innova<sup>®</sup> 2300, ZDA), dokler suspenzija ni dosegla optične gostote 0,37 pri valovni dolžini 590 nm. 1 ml bakterijske kulture smo aseptično prenesli v ohlajene mikrocentrifugirke ter jih 10 minut inkubirali na ledu. Nato smo jih 2 min centrifugirali pri 12000 vrt./min in 4°C (centrifuga Beckmann). Po centrifugiranju smo supernatant previdno odstranili, usedlino pa počasi resuspendirali v 500  $\mu$ l ledeno hladne 0,1 M raztopine CaCl<sub>2</sub>. Po 10-minutni inkubaciji na ledu smo resuspendirane celice centrifugirali 2 min pri 12000 vrt./min in 4°C. Postopek spiranja bakterijskih celic z ledeno hladno 0,1 M raztopino CaCl<sub>2</sub> smo dvakrat ponovili. Po zadnjem centrifugiranju (12000 vrt./min, 2 min, 4°C) in odstranitvi supernatanta smo bakterijsko usedlino previdno resuspendirali v 50  $\mu$ l ledeno hladnega 0,1 M CaCl<sub>2</sub> in jih do uporabe hranili na ledu.

### 3.8.5 Transformacija

Ledenohladno suspenzijo kompetentnih celic *E. coli* DH5 v 0,1 M CaCl<sub>2</sub> smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko, dodali 6  $\mu$ l ligacijske mešanice in narahlo premešali. Po 10-minutni inkubaciji na ledu smo mešanico za 2 minuti prenesli v vodno kopel, ogreto na 42°C. Mešanici smo dodali 500  $\mu$ l tekočega gojišča po LB, nežno premešali in inkubirali 45 minut pri 37°C z rahlim stresanjem na rotacijskem stresalniku (50 vrt./min). Po

inkubaciji smo na površino 10 plošč krvnega agarja z antibiotikom ampicilinom (120 µg/ml) s spatulo po Drigalskem enakomerno nanесли 50 µl suspenzije transformiranih celic DH5 in jih gojili pri 37°C 48 ur. Transformanto s hemolitično aktivnostjo, ki smo jo poimenovali pHEM, smo hkrati nacepili na svežo ploščo krvnega agarja z Ap (120 µg/ml) in ploščo po LB z Ap (100 µg/ml) ter X-Gal.

### **3.8.6 Izolacija plazmidne DNA s CTAB in Tritonom X-100 (Del Sal in sod., 1988)**

Polno cepilno zanko kulture klona pHEM, ki smo jo posneli s plošče krvnega agarja z Ap, smo resuspendirali v 200 µl pufra STET. Dodali smo 4 µl lizocima (50 mg/ml) in previdno premešali. Po 5-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo mikrocentrifugirko za 45 sekund postavili v vrelo vodo. Sledilo je 10-minutno centrifugiranje pri 12000 vrt./min in sobni temperaturi v namizni centrifugi (Eppendorf Centrifuge 5417C). Precipitat smo odstranili s sterilnim zobotrebcem, supernatantu pa dodali 8 µl raztopine CTAB (5% (w/v) v vodi) ter narahlo premešali. Po ponovnem centrifugiranju (12000 vrt./min, 5 minut, sobna temperatura) in odstranitvi supernatanta smo nastalo oborino resuspendirali v 300 µl 1.2 M NaCl. Dodali smo 750 µl 96-odstotnega EtOH in centrifugirali 10 minut pri 12000 vrt./min in sobni temperaturi. Po odstranitvi supernatanta smo usedlino očistili s 500 µl 80-odstotnega EtOH. Ves etanol smo odstranili, usedlino osušili in resuspendirali v 30 µl pufra TE z RNazo (50 µg/ml). Velikost plazmidne DNA z vključkom smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo razrezane plazmidne DNA.

### **3.8.7 Restrikcija plazmidne DNA**

Plazmidno DNA klona pHEM smo razrezali z restriksijsko endonukleazo *Pst*I (CTGCA↓G) (10 U/µl; Fermentas Life Sciences). Restrikcija je potekala v mešanici: 1 µl *Pst*I, 1 µl 10×pufra O (oboje Fermentas Life Sciences), 2 µl plazmidne DNA pHEM v TE z RNazo in 6 µl sterilne deionizirane vode. Pokrovček mikrocentrifugirke smo oblepili z zaščitnim filmom in restriksijsko mešanico inkubirali 45 minut pri 37°C v vodni kopeli. Prisotnost in velikost plazmidne DNA z vključkom smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo v 0,9-odstotnem agaroznem gelu v 1×TBE. Za pripravo gela smo uporabili 0,27 g agaroze (SeaKem® LE Agarose, Cambrex Bioscience Rockland, Inc., ZDA) in 30



ml 1× Tris-boratnega pufru (1×TBE). Nadaljnji potek je bil enak, kot je opisan v podpoglavju 3.6. Ob vzorcu smo nanесли velikostni standard, t.j. 1 kb lestvico (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas Life Sciences) in plazmidni vektor pUC19, rezan z restriktazo *Pst*I (ostanek restriksijske mešanice po ligaciji, shranjen pri -20°C).

### 3.8.8 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja DNA vključka pHEM

Plazmidno DNA z vstavljenim fragmentom kromosomske DNA seva *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 z zapisom za hemolitično aktivnost smo izolirali s kompletom GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas Life Sciences) po navodilih proizvajalca in jo raztopili v 40 µl pufru EB (Elution Buffer). Uporabili smo jo kot matrico za reakcije ugotavljanja nukleotidnega zaporedja, ki so jih izvedli po naročilu v podjetju Microsynth (Švica) (<http://www.microsynth.ch>) z metodo sprehajanja z začetnimi oligonukleotidi (*angl.* "primer walking"). Pri tem so za začetek uporabili standardne začetne oligonukleotide M13 (TGTAACGACGGCCAG) in M13rev (CAGGAAACAGCTATGACC) (<http://www.microsynth.ch>), ki se vežejo na vektor tik ob vključku na levi in desni strani. Nadaljnje začetne oligonukleotide so pripravili na osnovi dobljenih predhodnih zaporedij. Sekvenciranje je bilo končano, ko smo dobili prekrivajoča se zaporedja na sredini vključka.

Nukleotidno zaporedje DNA vključka pHEM smo analizirali z orodji BCM Search Launcher-ja (<http://searchlauncher.bcm.tcm.edu>) (Smith in sod., 1996) in NCBI (National Centre for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Z algoritmom ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orf.cgi>) smo z iskalnimi parametri bakterijski genski kod in ATG ter alternativnimi iniciacijskimi kodoni poiskali potencialne odprtebralne okvirje (*orf*, *angl.* open reading frame) na + in – verigi DNA. Vse možne *orf*-e smo analizirali z algoritmom BLAST (*angl.* Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul in sod., 1990) v bazi neredundantnih proteinskih zaporedij. V rezultatih smo prikazali le homologne zadetke, ki so bili daljši od 100 aminokislin. *orf*-e smo primerjali s podatki, dobljenimi z orodjem FGENESB (Bacterial Operon and Gene Prediction) SoftBerry-ja (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>).

### 3.8.9 Subkloniranje

#### 3.8.9.1 Priprava plazmidne DNA klona pHEM

Plazmidno DNA klona pHEM smo hkrati razrezali z dvema restrikcijskima endonukleazama *Bam*HI (G↓GATCC)(10 U/μl) in *Hind*III (A↓AGCTT)(10 U/μl) (oboje Fermentas Life Sciences), ki smo ju izbrali na podlagi rezultatov restrikcijskega mapiranja s programom NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) (Vincze in sod., 2003). Izbrana encima nimata prepoznavnega zaporedja znotraj vključka DNA, režeta pa v poliklonskem mestu plazmidnega vektorja pUC19 pred (*Hind*III; v smeri 5'→3') oz. za (*Bam*HI; v smeri 5'→3') prepoznavnim mestom za restrikcijsko endonukleazo *Pst*I.

Reakcijsko mešanico za dvojno restrikcijo smo pripravili v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki tako, da smo zmešali 3 μl (30 U) *Bam*HI, 3 μl (30 U) *Hind*III (oboje Fermentas life Sciences), 6 μl 10×pufer B (Boehringer, Nemčija), 40 μl plazmidne DNA pHEM v pufru EB in 8 μl sterilne deionizirane vode. Pokrovček mikrocentrifugirke smo oblepili z zaščitnim filmom in restrikcijsko mešanico inkubirali preko noči pri 37°C v vodni kopeli.

Po končani inkubaciji smo fragmente DNA ločili z agarozno gelsko elektroforezo v 0,8-odstotnem agaroznem gelu v 1×TBE. Fragmente velikosti 11,3 kbp smo s sterilnim skalpelom izrezali iz agaroznega gela, jih očistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) po navodilih proizvajalca in raztopili v 30 μl pufru EB.

#### 3.8.9.2 Restrikcija 11,3 kbp DNA fragmenta

Restrikcijske endonukleaze oz. pare restrikcijskih endonukleaz za reakcije subkloniranja zapisa za hemolitično aktivnost pHEM smo izbrali glede na razpoložljivost v laboratoriju, kjer je poskus potekal in rezultatov restrikcijske *in silico* analize nukleotidnega zaporedja DNA vključka s programom NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). Pri tem smo upoštevali velikost izbranega fragmenta oz. enostavnost razlikovanja fragmentov po restrikciji z agarozno gelsko elektroforezo, prisotnost prepoznavnega mesta za restriktazo v plazmidnem vektorju pUC19 ter pozicijo prepoznavnega mesta za restrikcijsko endonukleazo v vključku (subklonirani fragment naj

bi poleg nukleotidnega zaporedja z zapisom za izbrani protein vseboval nič oz. malo ostalih kodirajočih regij).

**Preglednica 4:** Uporabljene restriktaze, organizmi, od koder so bile izolirane, restrikcijska mesta, tip koncev, ki nastanejo po restrikciji in pripadajoči puferi

Restrikcijski encim	Vir	Prepoznavno zaporedje (5'→3')	Mesto restrikcije	Tip koncev	Pripadajoči pufer
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	GGATCC	G↓GATCC CCTAGC	5'-ostri	<i>Bam</i> HI
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	GAATTC	G↓AATTC CTAA↑G	5'-ostri	<i>Eco</i> RI
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	AAGCTT	A↓AGCTT TTCGA↑A	5'-ostri	<i>Hind</i> III
<i>Kpn</i> I	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK8	GGTACC	GGTAC↓C C↑CATGG	3'-ostri	<i>Kpn</i> I
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuarti</i>	CTGCAG	CTGCA↓G G↑ACGTC	3'-ostri	O
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus</i> G	GTCGAC	G↓TCGAC CAGCT↑G	5'-ostri	O

DNA fragmente, nastale po restrikciji očiščenega DNA fragmenta s parom restrikcijskih endonukleaz oz. restrikcijsko endonukleazo (vse Fermentas Life Sciences) smo vključili v plazmidni vektor pUC19, razrezan z ustreznimi (enakimi) pripadajočimi restriktazami in vnesli v kompetentne celice DH5. Shema subkloniranja je prikazana na str. 52.

Restrikcijska mešanica je vsebovala: 17 µl očiščenega 11,3 kbp DNA fragmenta, 1 µl restrikcijske endonukleaze (10 U) (*Eco*RI oz. *Kpn*I) in 2 µl 10×pufer (*Eco*RI oz. *Kpn*I) (oboje Fermentas Life Sciences).

Restrikcijsko mešanico za dvojno restrikcijo smo pripravili po priporočilu proizvajalca (DoubleDigest™Engine, Fermentas Life Sciences) tako, da smo zmešali 16 µl očiščenega 11,3 kbp DNA fragmenta, 1 µl (10 U) restrikcijske endonukleaze *Eco*RI, 1 µl (10 U) restrikcijske endonukleaze *Sal*I in 2 µl 10×pufer O (vse Fermentas Life Sciences).

Restriksijska mešanica za razrez plazmidnega vektorja pUC19 je vsebovala: 3 µl pUC19 v pufri EB, 1 µl (10 U) restriksijske endonukleaze *KpnI*, 1 µl 10×pufer *KpnI* (oboje Fermentas Life Sciences) in 5 µl sterilne deionizirane vode.

Restriksijsko mešanico za dvojno restrikcijo plazmidnega vektorja smo pripravili tako, da smo zmešali 3 µl pUC19 v pufri EB, 1 µl (10 U) restriksijske endonukleaze *EcoRI*, 1 µl (10 U) restriksijske endonukleaze *SalI* ter 10×pufer O (vse Fermentas Life Sciences) oz. 1 µl (10 U) restriksijske endonukleaze *EcoRI*, 1 µl (10 U) restriksijske endonukleaze *BamHI* (oboje Fermentas Life Sciences) ter 10×pufer B (Boehringer, Nemčija) in dopolnili do 10 µl s sterilno deionizirano vodo.

Restriksijske mešanice smo oblepili z zaščitnim filmom in inkubirali 1 uro pri 37°C v vodni kopeli.

Restriksijsko reakcijo pUC19 s parom restriksijskih endonukleaz *EcoRI* in *SalI* smo zaustavili z 20-minutno inkubacijo pri 68°C v vodni kopeli.

Preostale restriksijske mešanice smo nanegli na 0,9-odstotni agarozni gel v 1×TBE in fragmente ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Ob vzorcih smo kot velikostni standard nanegli 1 kb lestvico. Izbrane fragmente velikosti 3114 bp, 1618 bp, 3110 bp ter plazmidni vektor pUC19, razrezan s *KpnI* oz. *EcoRI* in *BamHI* smo izrezali iz gela s sterilnim skalpelom, očistili s kompletom QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) po navodilih proizvajalca in raztopili v 20 µl oz. 10 µl pufra EB.

### 3.8.9.3 Ligacija, transformacija in ugotavljanje velikosti vključka DNA

Ligacijska mešanica je vsebovala 4 µl 5×pufra, 1 µl ligaze T4 (oboje Fermentas Life Sciences), 13 µl očiščenega fragmenta velikosti 1618 bp in 2 µl očiščenega, s *KpnI* razrezanega pUC19 oz. 13 µl očiščenega fragmenta velikosti 3110 bp in 2 µl očiščenega, z *EcoRI* in *BamHI* razrezanega pUC19 oz. 14 µl očiščenega fragmenta velikosti 3114 bp in 1 µl pUC19, razrezanega s parom restriktaz *EcoRI* in *SalI*.

Ligacijske mešanice smo inkubirali 1 uro pri 22°C v vodni kopeli in jih transformirali v kompetentne celice DH5 po postopku, ki je opisan v podpoglavju 3.8.4. 100 µl posamezne

transformacijske mešanice smo po končani inkubaciji v tekočem gojišču po LB pri 37°C s spatulo po Drigalskem enakomerno nanesti na površino 2 plošč po LB z dodanim Ap (100 µg/ml) in X-Gal. Po prekonočni inkubaciji pri 37°C smo neobarvane kolonije z vsake plošče posamezne transformacijske mešanice hkrati cepili na sveže gojišče po LB z Ap in X-Galom ter plošče krvnega agarja z Ap (120 µg/ml). Po 48 urah inkubacije pri 37°C smo na slednjih opazovali pojav lize eritrocitov.

Plazmidno DNA klonov pLIP z DNA vključkom velikosti 3114 bp, pARP z DNA vključkom velikosti 1618 bp in pTAP z DNA vključkom velikosti 3110 bp smo izolirali s CTAB in Tritonom X-100 (postopek je prikazan v podpoglavju 3.8.6) in jo razrezali z ustreznimi restrikcijskimi endonukleazami: plazmidno DNA pARP z restriktazo *KpnI*, plazmidno DNA pLIP s parom restrikcijskih endonukleaz *EcoRI* in *SalI* ter plazmidno DNA pTAP s parom restrikcijskih endonukleaz *EcoRI* in *BamHI*.

Prisotnost in velikost DNA vključka smo ugotavljali z agarozno gelsko elektroforezo razrezane plazmidne DNA pARP, pLIP, pTAP v 0,9-odstotnem agaroznem gelu v 1×TBE.

### 3.9 GOJIŠČA, RAZTOPINE, PUFRI, ENCIMI

#### 3.9.1 Gojišča

Osnovo gojišč za izolacijo bakterij je predstavljalo gojišče za mikoplazme, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca (Mycoplasma Broth Base, Oxoid Ltd., Anglija). 25,5 g sestavin v prahu smo med mešanjem z magnetnim mešalom raztopili v 1 l destilirane vode. Tako pripravljeno osnovo (MBB) smo alikvotirali v štirinajst 250-mililitrskih erlenmajeric, gojiščem Z,W,X,Y,V,T,S,R pa dodali tudi ustrezen volumen destilirane vode (količino alikvotiranega gojišča in dodane destilirane vode prikazuje **Preglednica 5**). V vseh primerih smo dodali 1,7 ut.% agarja Noble (Difco Laboratories, ZDA) in gojišča sterilizirali z avtoklaviranjem (15 min, 121°C, tlak 1,2 bar) (avtoklav Kambič).

Za pripravo gojišč s konjskim serumom (gojišča B, C, D, E in F) smo izvornemu gojišču (MBB), ohlajenemu na 55°C, dodali različne volumne bogatitve (BBL™ Mycoplasma Enrichment without Penicillin s sestavo: 20 ml konjskega seruma, 10 ml kvasnega ekstrakta, 50 mg talijevega acetata). Za pripravo gojišč s humanim serumom pa 5 ml

(gojišči S in R) oz. 10 ml (gojišča W, X, Y, V in T) humanega seruma. Humani serum smo pripravili tako, da smo 0,2 µl filtriranega in liofiliziranega humanega seruma (Sigma Aldrich) raztopili v 90 ml sterilne destilirane vode.

Gojiščem A, C, E ter Z, X, V in S smo sterilno dodali 80 µl antimikotika amfotericina B (5 mg/ml v sterilni destilirani vodi; SQUIBB-von Heyden GmbH, Nemčija). Po 15-25 ml posameznega gojišča smo alikvotirali v sterilne plastične petrijevke.

**Preglednica 5:** Sestava gojišč za izolacijo bakterij, ki so temeljila na gojišču za mikoplazme (MBB) (KS...konjski serum)

Gojišče <sup>a</sup>	Sestava [ml]		Gojišče <sup>a</sup>	Sestava [ml]		
	MBB	Bogatitev s KS		MBB	Humani serum	Dest. H <sub>2</sub> O
A	100	/	Z <sup>b</sup>	20	/	80
B	70	30	W	20	10	70
C <sup>b</sup>	80	20	X <sup>b</sup>	30	10	60
D	90	10	Y	40	10	50
E <sup>b</sup>	95	5	V <sup>b</sup>	55	10	35
F	98	2	T	70	10	20
			S <sup>b</sup>	30	5	65
			R	70	5	25

<sup>b</sup> gojišču je dodan antimikotik amfotericin B (4 µg/ml)

<sup>a</sup> vsem gojiščem dodan 1,7 ut. % agarja Noble

Tekoče gojišče (Z<sub>j</sub>) za odvzem in pripravo vzorca smo pripravili tako, da smo zmešali 10 ml osnovnega gojišča MBB (pripravljeno po zgoraj opisanem postopku) in 40 ml destilirane vode.

Osnova gojišča z jajcem (MBB+J) je bilo z avtoklaviranjem (15 minut, 121°C, tlak 1,2 bar) sterilizirano osnovno gojišče (MBB). Ohlajenemu gojišču na 55°C smo dodali kokošje jajce (površino jajca smo očistili s 96-odstotnim EtOH ter ga ubili v sterilno čašo), vsebino premešali z magnetnim mešalom in razlili v sterilne petrijevke premera 7 cm. Gojišču smo prav tako dodali 1,7 ut. % agarja Noble (Difco).

Tekoče gojišče po Lurii in Bertaniju (LB) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Roth). 12,5 g sestavin v prahu (LB-Medium (Luria/Miller); Roth, GMBH&CO) smo med mešanjem z magnetnim mešalom raztopili v 500 ml destilirane vode, alikvotirali po 20 ml

v steklene (150 ml) erlenmajerice in sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121°C, tlak 1,2 bar).

Za pripravo tekočih gojišč po LB z dodanim antibiotikom ampicilinom (Ap) (100 µg/ml) smo gojišču pred uporabo dodali 20 µl Ap (100 mg/ml v sterilni destilirani vodi; Roth).

Trdno gojišče po LB smo pripravili tako, da smo 25 g sestavin v prahu (LB-Medium (Luria/Miller); GMBH&CO, Roth, Nemčija) in 15 g agarja (Roth, Nemčija) raztopili v 1 l destilirane vode med mešanjem z magnetnim mešalom ter sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121°C, tlak 1,2 bar). Po 15-20 ml ohlajenega gojišča smo alikvotirali v sterilne plastične petrijevke premera 15 cm.

Za pripravo gojišč LB z dodanim antibiotikom Ap (100 µg/ml gojišča) in X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid) smo kot osnovo uporabili gojišče po LB, ki smo ga pripravili po zgoraj opisanem postopku. Ohlajenemu gojišču na 55°C smo sterilno dodali 1 ml ampicilina (100 mg/ml v sterilni destilirani vodi; Roth, Nemčija), premešali z magnetnim mešalom in alikvotirali v petrijevke. Gojišča smo uporabili najkasneje dan po pripravi. Pred uporabo smo na površino gojišč s spatulo po Drigalskem enakomerno nanесли 40 µl X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid; 20 mg/ml v dimetilformamidu; Fermentas Life Sciences).

Gojišče po Mueller-Hinton-u (MH) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Biolife S.r.l., Italija). 21 g sestavin v prahu in 15 g agarja (Roth, Nemčija) smo raztopili v 1 l destilirane vode med mešanjem z magnetnim mešalom in sterilizirali z avtoklaviranjem (15 minut, 121°C, tlak 1,2 bar; avtoklav Kambič). 15-20 ml ohlajenega gojišča smo razlili v plastične sterilne petrijevke premera 15 cm.

Krvni agar smo pripravili po navodilih proizvajalca (Biolife S.r.l., Italija) tako, da smo 40,5 g sestavin v prahu (Blood Agar Base) med mešanjem z magnetnim mešalom raztopili v 1 litru destilirane vode. Avtoklaviranemu gojišču (15 minut, 121°C, tlak 1,2 bar), ohlajenemu na 55°C, smo sterilno dodali 5% goveje krvi (IVZ; Inštitut za varovanje zdravja, Ljubljana), premešali z magnetnim mešalom in razlili v sterilne plastične petrijevke premera 15 cm.

Za pripravo krvnih gojišč z antibiotikom ampicilinom (Ap) (120 µg/ml) smo 1 l osnovnega gojišča po sterilizaciji poleg goveje krvi dodali še 1,2 ml antibiotika Ap (100 mg/ml).

Za pripravo modificiranega gojišča s hitinom (CH, *angl.* chitin) (Popavath in sod., 2008) smo v destilirani vodi raztopili 0,081 g Nutrient Broth (Difco Laboratories, ZDA), 0,15 g NaCl (Merck), 1,7 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), 0,75 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb), 0,25 g NH<sub>4</sub>Cl (Merck) in 0,65 g agarja Noble (Difco), dopolnili do 50 ml ter dodali 0,2 g v terilnici strtega koloidnega hitina (Sigma Aldrich). Avtoklavirano (15 min, 121°C, tlak 1,1 bar) in ohlajeno gojišče smo alikvotirali v sterilne plastične petrijevke premera 7 cm.

Za pripravo 500 ml trdnega gojišča s karboksimetilcelulozo (CMC) smo posebej pripravili 1 M MgSO<sub>4</sub> in osnovno gojišče (0,5 g NaNO<sub>3</sub> (Merck), 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), 0,5 g KCl (Merck), 0,25 g kvasnega ekstrakta (Difco), 0,5 g glukoze (Kemika), 2,5 g karboksimetil celuloze (CMC, *angl.* carboxymethylcellulose) (Sigma Aldrich) in 7,5 g agarja Noble (Difco)) ter ju sterilizirali z avtoklaviranjem (15 min, 121°C, tlak 1,1 bar). 1M MgSO<sub>4</sub> smo pripravili tako, da smo 24,65 g MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O (Merck) raztopili v destilirani vodi in dopolnili do 100 ml. Avtoklaviranemu gojišču, ohlajenemu na 55°C smo dodali 2 ml 1M MgSO<sub>4</sub>, narahlo premešali in alikvotirali v sterilne plastične petrijevke.

### 3.9.2 Rastopine, pufri, encimi

#### 3.9.2.1 Barvanje po Gramu

Rastopina **kristalvijoličnega** (Sigma Aldrich): 2,3% kristalvijoličnega, 0,1% amonijevega oksalata, 20% (v/v) etilnega alkohola

**Lugolova rastopina** (Merck): razredčena vodna rastopina I<sub>2</sub> in KI

**Safranin** (Safranin O, Merck): 0,5% (w/v) v vodi



### 3.9.2.2 Celulazna aktivnost

**Kongo rdeče** (0,1% vodna raztopina konga rdeče): 0,05 g kongo rdečega barvila (Merck) smo raztopili v 50 ml destilirane vode, zavili v aluminijasto folijo in shranili pri 4°C

**1M NaCl**: 58,44 g NaCl (Merck) smo raztopili v 800 ml destilirane vode, dopolnili do 1000 ml in sterilizirali z avtoklaviranjem

## 3.9.3 Kemikalije, pufri in encimi za izolacijo DNA

### 3.9.3.1 Izolacija kromosomske DNA

#### 1× TE Tris EDTA (TE) pH 8,0

10 mM Tris-Cl (pH 8,0)

1 mM EDTA (etilendiaminotetraocetna kislina) (pH 8,0) (Kemika, Hrvaška)

#### 1 M Tris-Cl pH 8,0

121,1 g Tris baze (Tris(hidroksimetil)-aminometan) (Roth)

800 ml H<sub>2</sub>O

pH uravnamo z dodatkom 42 ml koncentrirane HCl (Merck) in dopolnimo s H<sub>2</sub>O do 1000 ml

**TE z RNazo (50 µg/ml)**: 5µl raztopine RNaze A (10 mg/ml) smo raztopili v 995 µl pufra TE.

#### **RNaza A**

10 mg/ml; shranjena v 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

### 3.9.3.2 Izolacija plazmidne DNA

#### **STET**

8% saharoza (Kemika, Hrvaška)

0,1% Triton X-100 (Sigma)

50 mM EDTA (etilendiaminotetraocetna kislina) (Kemika, Hrvaška)

50 mM Tris-HCl pH 8,0

**Lizocim (50 mg/ml):** 50 mg lizocima (100000 U/mg, Fluka) smo raztopili v 1 ml sterilne destilirane vode in shranili pri -20°C

**CTAB/H<sub>2</sub>O:** 5% (w/v) heksadeciltrimetilamonijev bromid (Fluka)

**1,2 M NaCl:** 70,13 g NaCl (Merck) smo raztopili v 800 ml destilirane vode, dopolnili do 1000 ml in sterilizirali z avtoklaviranjem

**TE z RNAzo (50 µg/ml):** priprava opisana v podpoglavju 3.9.3.1

### **3.9.4 Kemikalije za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)**

#### **Izhodiščna zmes (Master Mix)**

0,05 U/µl rekombinantne Taq DNA-polimeraze v reakcijskem pufri, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM posameznega deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Fermentas Life Sciences

### **3.9.5 Horizontalna agarozna gelska elektroforeza**

#### **5×TBE**

54 g Tris-baze (Tris(hidroksimetil)-aminometan) (Roth)

27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Roth)

20 ml 0,5M EDTA (pH 8,0) (Kemika, Hrvaška)

destilirana voda do 1000 ml

**1×TBE** (1-kratni Tris-boratni pufer):

100 ml 5×TBE

400 ml destilirane vode

**Nanašalni pufer (6× Loading Dye)**

10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% ksilencianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 0,03% bromofenol modro; Fermentas Life Sciences

**Etidijev bromid (EtBr)**: založna raztopina EtBr (Sigma) v vodi (10 mg/ml)

**1 kb lestvica** (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use)

0,1 µg/µl; shranjena v 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,005% bromofenol modro, 0,005% ksilen cianol FF, 10% glicerol; Fermentas Life Sciences

### **3.9.6 Kemikalije, encimi in pufri, ki smo jih uporabili za kloniranje in subkloniranje zapisa za hemolitično aktivnost seva *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1**

**0,1 M CaCl<sub>2</sub>**: 7,35 g CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O (Merck) smo raztopili v 500 ml destilirane vode, raztopino sterilizirali z avtoklaviranjem in shranili pri 4°C

Restriksijska endonukleaza ***Bam*HI**

10 U/µl; shranjena v 10 mM Tris-HCl (pH 7,4 pri 25°C), 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,15% Triton X-100, 0,2 mg/ml BSA in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

Restriksijska endonukleaza ***Eco*RI**

10 U/µl; shranjena v 10 mM kalijeve fosfatu (pH 7,4 pri 25°C), 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 0,15% Triton X-100 in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

**Restriksijska endonukleaza *HindIII***

10 U/ $\mu$ l; shranjena v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 pri 25°C), 250 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

**Restriksijska endonukleaza *KpnI***

10 U/ $\mu$ l; shranjena v 10 mM Tris-HCl (pH 7,5 pri 25°C), 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

**Restriksijska endonukleaza *PstI***

10 U/ $\mu$ l; shranjena v 10 mM Tris-HCl (pH 7,4 pri 25°C), 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,15% Triton X-100, 0,2 mg/ml BSA in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

**Restriksijska endonukleaza *SalI***

10 U/ $\mu$ l; shranjena v 10 mM Tris-HCl (pH 7,4 pri 25°C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,2 mg/ml BSA in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

**10×Puffer B**

10 mM Tris-HCl (pH 8 pri 37°C), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl in 1 mM 2-merkaptoetanol; Boehringer Manheim Biochemicals

**Ligaza T4**

5U/ $\mu$ l; shranjena v 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM DTT, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA in 50% (v/v) glicerolu; Fermentas Life Sciences

**10 X T4 DNA puffer za ligacijo**

400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7,8 at 25°C); Fermentas Life Sciences

### 3.10 BAKTERIJSKI SEVI

Laboratorijski sev *E.coli* DH5 recA1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) relA1  $\Delta(lacZYA-argF)$  ( $\phi$  80lacZ  $\Delta$ M15); zbirka Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete.

Laboratorijski sev **CL 247** (DH5) recA1 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) relA1  $\Delta(lacZYA-argF)$  ( $\phi$  80lacZ  $\Delta$ M15) *pUC19 Ap<sup>r</sup>*; zbirka Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete (vir DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

## 4 REZULTATI

### 4.1 IZOLACIJA BAKTERIJ IN GOJENJE ČISTIH KULTUR

S fazno kontrastno mikroskopijo smo med pregledovanjem papilarnih regij spranih čreves petih navadnih prašičkov *P. scaber* na dveh preparatih (iz katerih smo pripravili vzorca P2 in P4) opazili prisotnost posameznih ali v rozetah razporejenih paličastih bakterij, ki so bile pritrjene na kutikularne trne stene zadnjega črevesa. Kljub natančnemu pregledovanju trdnih gojišč (katerih osnova je temeljila na gojišču za mikoplazme), ki smo jih hranili več mesecev, dokler niso postala neuporabna, predstavnikov iskanih mikoplazem nismo odkrili. Smo pa izolirali in uspešno gojili druge predstavnike indigene črevesne mikroflore *P. scaber* iz vseh sedmih vzorcev (P1-P5 ( P1k-P5k), P6 (a,b), P7 (a,b)) zadnjega črevesa navadnega prašička. Večina bakterijskih kolonij in posledično tudi večina izbranih izolatov je zrasla na osnovnih gojiščih za mikoplazme, ki niso bila obogatena s konjskim ali humanim serumom (t.j. gojišče A in Z). Na teh gojiščih je bila številčnost bakterij največja, ni pa nikoli presegala 50 kolonij/ploščo. Makromorfološka raznolikost zraslih kolonij je bila majhna. Na gojiščih E in F ter Z, X in S, ki so vsebovala manjše volumne bogatitve s konjskim serumom oziroma razredčeno osnovno gojišče s humanim serumom je zraslo manjše število kolonij, do 10. Izjema je bil vzorec P3, na katerem je zraslo več makromorfološko podobnih kolonij ne glede na vrsto uporabljenega gojišča (A, E, Z, X, V in J). Bakterij na močno obogatenih gojiščih (B, C, D ter Y, V( z izjemo vzorca P3), T in R)) nismo uspeli izolirati.

Skupaj smo izolirali 19 izolatov. Izvor izolatov, gojišče, na katerem so zrasli v postopku izolacije in makromorfološki opis izolatov so podani v **Preglednici 6**. Poskušali smo izolirati čim bolj različne izolate in tako povečati verjetnost, da izoliramo tudi iskane paličaste mikoplazme.

**Preglednica 6:** Aerobni izolati iz zadnjega črevesa *P. scaber*, ter makromorfološki opis domnevno čistih kultur.

Izolat	Vir	Gojišče	Makromorfološki opis
P2-S5	P2	S	Rumena,okrogla
P2-W2	P2	W	Velika, bela, mazava, nepravilne oblike
P3-E2	P3	E	Svetlo oranžna, neprosojna, okrogla, dvignjena
P3-V1	P3	V	Bela,okrogla, mazava z mokro površino
P3-Z2	P3	Z	Oranžna, neprosojna, okrogla, dvignjena
P3-Z5	P3	Z	Rumena, okrogla
P3-Z6	P3	Z	Rumena, umbilicirana, z nepravilnim robom
P4-S3	P4	S	Rumena, neprosojna, okrogla, dvignjena
P4-X3	P4	X	Svetlorumena, svetleča, okrogla
P4-X5	P4	X	Bela, nepravilna, sluzasta
P4-X6	P4	X	Svetlorumena, rizoidna
P5-X1	P5	X	Drobna, bela, umbilicirana
P6a-Z1	P6a	Z	Svetlorjava, ploska, drobna
P6a-Z3	P6a	Z	Svetlorumena, z mokro površino
P6a-Z4	P6a	Z	Svetlorumena, svetleča, z gladkim robom
P6a-W1	P6a	W	Rumena, rizoidna, dvignjena
P7a-A1	A1	A	Svetlorumena, svetleča, okrogla, dvignjena
P7a-A4	P7a	A	Prosojna, drobna, svetleča, nepravilne oblike
P7a-A16	P7a	A	Bela, ploska, nepravilna

Mikromorfologijo celic bakterijskih izolatov smo opazovali na gramsko obarvanih preparatih. Devet bakterijskih izolatov se je po Gramu barvalo nedvoumno pozitivno (P7a-A16, P3-E2, P2-S5, P3-Z2, P2-W2, P6a-W1, P4-S3, P3-Z5, P3-Z6), nadaljnjih sedem po Gramu negativno (P3-V1, P4-X5, P7a-A1, P4-X3, P4-X6, P6a-Z3, P6a-Z1), izolata P6a-Z4 in P7a-A4 spremenljivo, izolat P5-X1 pa se je obarval po Gramu šibko pozitivno oz. se ni barval.

Celice so bile mikromorfološko podobne; prevladovale so podaljšane kroglaste oblike ali kratke paličice v skupkih; posamične celice smo redko opazili. Pri izolatu P6a-Z1 so prevladovale pravilne kroglaste oblike, razporejene v parih in obdane z ovojnico. Celice izolata P2-S5 so bile prav tako kroglaste oblike v tetradah ali skupkih. Drobne podaljšane kroglaste celice so prevladovale pri izolatih P3-V1 in P4-X5. Celice izolata P7a-A4, ki se je po Gramu barval spremenljivo, so bile posamične kroglaste in kratke paličaste oblike,

občasno povezane v verige. Mikroskopski preparat izolata P5-X1, ki se po Gramu ni barval (oz. se je barval šibko pozitivno), je razkril drobne kroglaste oblike v verižicah, med katerimi so bili nameščeni filamentni.

Rezultati barvanja po Gramu in mikromorfološki opis so podani v **Preglednici 8**, skupaj z rezultati ostalih fenotipskih testov.

#### 4.2 IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATOV

Devetnajst izbranih bakterijskih izolatov smo na podlagi analize celotnega nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNA (izolati P2-S5, P3-Z2, P3-Z5, P3-Z6, P4-X3, P4-X5, P4-X6, P4-S3, P6a-Z3, P6a-Z4, P6a-W1) oziroma le dela gena (izolati P2-W2, P3-E2, P3-V1, P5-X1, P6a-Z1, P7a-A1, P7a-A4, P7a-A16) (Priloga A1 in Priloga A2) identificirali z orodjem Classifier RDP II.10 (RDP Naïve Bayesian rRNA Classifier Version 2.0, julij 2007) (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) (Wang in sod., 2007) (z mejo zaupanja 80%). Izolate smo uvrstili v deset različnih rodov znotraj treh bakterijskih debel (*Proteobacteria*, *Firmicutes* in *Actinobacteria*). Osem izolatov smo uvrstili v deblo *Proteobacteria* (*Alphaproteobacteria* ter *Gammaproteobacteria*) in sicer predstavnika rodu *Ochrobactrum* (P3-V1 in P4-X5), *Enhydrobacter* (P6a-Z1) ter *Stenotrophomonas* (P7a-A1, P4-X3, P4-X6, P6a-Z3, P6a-Z4). V deblo *Actinobacteria* smo uvrstili devet izolatov in sicer predstavnike rodu *Microbacterium* (P6a-W1, P4-S3, P3-Z5, P3-Z6) in po en predstavnik rodu *Leucobacter* (P7a-A4), *Micrococcus* (P2-S5), *Brevibacterium* (P3-Z2), *Janibacter* (P2-W2) ter *Mycobacterium* (P5-X1). Deblo po Gramu pozitivnih bakterij z nizko vsebnostjo G+C *Firmicutes*, sta zastopala dva izolata iz rodu *Staphylococcus* (P7a-A16 in P3-E2).

V bazi RDP II.10 (Cole in sod., 2009) smo z orodjem Sequence Match poiskali najbolj podobna nukleotidna zaporedja v zbirki sekvenc 16S rRNA (daljših in krajših od 1200 bp, tipskih in netipskih ter gojenih in negojenih mikrobnih sevov). Iskanje je zajemalo nukleotidna zaporedja, ki so bila v bazi podatkov 4. aprila 2010. Najbolj podobna nukleotidna zaporedja so pripadala izoliranim ali neizoliranim bakterijam iz različnih okolij (sedimentov, prsti, jezer, morij, rastlin, biofilmov, spužev, želv, dinoflagelatov,



gastrointestinalnega trakta rib, hroščev, morskih konjičkov) z raznoliko geografsko distribucijo (jezero na Filipinih, arktični led, puščava v Tibetu ...).

Nukleotidna zaporedja nekaterih bakterijskih izolatov so bila identična sekvencam v zbirki zaporedij 16S rRNA; nukleotidno zaporedje P3-V1 je bilo identično zaporedju izolata *Ochrobactrum cystisi* (EU1874959), sposobnemu razgradnje kinolonov; P7S-A1 sevu *S. maltophilia* (FJ772015) iz rizosfere ginsenga; P6a-Z1 izolatu *Moraxella* sp. (FJ006859) iz močvirja Wopo; P7a-A16 oz. P3-E2 neizolirani bakteriji iz ostrigarja (AY838464) oz. izolatu (AY669172) iz tropskega morskega sedimenta; P2-Z2 izolatu rodu *Terrabacter* sp. (EU741152) oz. neizoliranemu predstavniku *Janibacter* sp. (FN582323) iz črevesa morskega konjička.

Nekatere sekvence, podobne sekvencam naših izolatov, izvirajo iz prebavil, npr. hrošča *Dendroctonus valens* (*S. maltophilia* FJ811851) in larve *Agrilus planipennis* neizolirane bakterije (EU149115), rib *Epinephelus cosoides* izolat (EU5203322) in *Danio rerio* (neizolirana bakterija DQ814775) ter morskih konjičkov (*Hippocampus guttulatus*) (neizolirani *Janibacter* sp. FN582323), vendar nobena iz prebavila kopenskih rakov enakonožcev.

Rezultati analize nukleotidnih zaporedij 16S rRNA bakterijskih izolatov so prikazani v **Preglednici 7**.

**Preglednica 7:** Aerobni izolati iz zadnjega črevesa navadnega prašička *P. scaber*, gojišče, s katerega so bili izolirani, uvrstitev v taksonomsko kategorijo (gis...genus/rod) (rezultati analize 16S rRNA z orodjem RDP II.10 Classifier); najbolj podobna zaporedja v zbirki sekvenc 16S rRNA (rezultati iskanja z orodjem RDP II.10 Sequence Match ), točke podobnosti z izolati ter vir izolacije. **Preglednica 7** se nadaljuje na naslednjih straneh.

Gojišče	Izolat	Klasifikacija (gis)	Najbolj podobna zaporedja v bazi podatkov	Vrednosti podobnosti	Vir
V	P3-V1	<i>Ochrobactrum</i> sp.	<i>Ochrobactrum cytisi</i> (EU1874959)	1,000	biofilm, ki razgrajuje kinolon
			<i>Ochrobactrum</i> sp. (GU248309)	0,998	/
			<i>Alpha proteobacterium</i> (AY162044)	0,997	prst
			<i>Ochrobacterium anthropi</i> (AJ242576)	0,997	kmetijska prst
			<i>Ochrobactrum lupini</i> (T) (AY457038)	0,997	koreninski vršiček zrnate stročnice ( <i>Lupinus albus</i> )
X	P4-X5	<i>Ochrobactrum</i> sp.	n.i.; <i>Ochrobactrum</i> sp. (EU560928)	1,000	zdržba, ki razgrajuje atrazin
			<i>Ochrobactrum</i> sp. (AY368533)	1,000	morska spužva ( <i>Porifera</i> )
			<i>Ochrobactrum</i> sp. (EF025738)	1,000	kontaminiran sediment s PAH
			n.i. (EU675764)	1,000	globokomorski sediment
			<i>Ochrobactrum anthropi</i> (AY917113)	1,000	/
A	P7a-A1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (FJ772015)	1,000	rizosfera ( <i>Panax</i> sp.)
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AJ870967)	0,992	obalna morska voda
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (EF178465)	0,989	riž ( <i>Oryza sativa</i> )
			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (FJ811851)	0,988	črevo hrošča ( <i>Dendroctonus valens</i> )
			n.i. (DQ256347)	0,987	podtalnica (Kalahari, Južna Afrika)
X	P4-X3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AM403590)	0,983	/
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AY826522)	0,947	hladilna voda jedrske elektrarne
			Izolat (FJ789666)	0,942	sojino steblo ( <i>Glycine max</i> )
			n.i. (AB483258)	0,936	komunalne odplake
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (DQ664206)	0,933	sladkovodni ribnik
X	P4-X6	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AM403590)	0,983	/
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AY826522)	0,947	hladilna voda jedrske elektrarne
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (DQ208664)	0,939	/
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AB461716)	0,930	sojino steblo ( <i>Glycine max</i> )
			izolat (AY822507)	0,920	obmorski plotni slak ( <i>Calystegia soldanella</i> )
Z	P6a-Z3	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AM403590)	0,983	/
			n.i. (AB483258)	0,951	sojino steblo ( <i>Glycine max</i> )
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AY826522)	0,947	hladilna voda jedrske elektrarne
			Izolat (FJ789666)	0,938	komunalne odplake
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (GQ985466)	0,938	korenina bambusa ( <i>Phyllostachys pubescens</i> )
Z	P6a-Z4	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AM403590)	0,986	/
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (EU374956)	0,983	z oljem kontaminiran pesek
			n.i. (AB483258)	0,957	sojino steblo ( <i>Glycine max</i> )
			<i>Stenotrophomonas</i> sp. (DQ208664)	0,955	/
			<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (DQ201397)	0,955	/
Z	P6a-Z1	<i>Enhydrobacter</i> sp.	<i>Moraxella</i> sp. (FJ006859)	1,000	močvirna voda (Wopo, Kitajska)
			n.i. (FJ790606)	0,995	roženec (puščava v Tibetu)
			n.i. <i>Enhydrobacter</i> sp. (EU305591)	0,980	čistilna naprava (Sanwayao, Kitajska)
			<i>Moraxella osloensis</i> (AJ505859)	0,976	jezerska voda
			n.i. (AB193927)	0,966	hidrotermalna voda

Gojišče	Izolat	Klasifikacija (gis)	Najbolj podobna zaporedja v bazi podatkov	Vrednosti podobnosti	Vir
A	P7a-A16	<i>Staphylococcus</i> sp.	n.i. (AY838464)	1,000	ostrigar ( <i>Pleurotus eryngii</i> )
			<i>Staphylococcus</i> sp. (AM084016)	1,000	/
			Izolat (EU520332)	1,000	gastrointestinalni trakt ribe ( <i>Epinephelus coioides</i> )
			n.i. (FM874433)	1,000	prah žimnice
			<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>Hominis</i> (AJ717375)	0,997	alkalna podtalnica
E	P3-E2	<i>Staphylococcus</i> sp.	Izolat (AY669172)	1,000	tropski morski sediment
			<i>Staphylococcus</i> sp. (AB166964)	1,000	globokomorski sediment (Kumano-nada, Japonska)
			<i>Staphylococcus</i> sp. (AJ551159)	0,997	vulkansko blato No.3, (Nankai Trough, Japonska)
			Izolat (AF468443)	0,995	led arktičnega morja
			<i>Staphylococcus</i> sp. (AM158918)	0,994	globokomorski sediment (Indijski ocean, Indija)
A	P7a-A4	<i>Leucobacter</i> sp.	<i>Leucobacter komagatae</i> (FJ544397)	0,854	/
			<i>Leucobacter</i> sp. (EU118777)	0,849	kontaminirana prst s težkimi kovinami
			n.i. <i>Leucobacter</i> sp. (EU371574)	0,837	lupina ostrige ( <i>Ostrea edulis</i> )
			Izolat (AF479358)	0,831	12000 let star led (Sajama, Bolivija)
			<i>Leucobacter alluvii</i> (EU741108)	0,815	morski sediment
S	P2-S5	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Micrococcus</i> sp. (AY561623)	1,000	kontaminirani sediment z jedrskimi odpadki
			<i>Micrococcus</i> sp. (DQ4488770)	1,000	morski sediment
			<i>Micrococcus</i> sp. (FJ457276)	1,000	mahovnjaki ( <i>Bryozoa</i> )
			<i>Micrococcus</i> sp. (FJ898316)	1,000	izvir (Kitajska)
			<i>Micrococcus</i> sp. (AJ871948)	0,995	sedimenti mangrov
Z	P3-Z2	<i>Brevibacterium</i> sp.	<i>Brevibacterium</i> sp. (DQ643097)	0,984	/
			n.i. <i>Brevibacterium</i> sp. (FJ493070)	0,977	naftni vzorec
			<i>Brevibacterium</i> sp. (AY949021)	0,976	obalna voda (Kitajska provinca Guangdong)
			Izolat (EU476029)	0,964	oralni izločki ( <i>Ips pini</i> )
			Izolat (FJ223850)	0,953	spužva ( <i>Porifera</i> , Mehiški zaliv)
W	P2-W2	<i>Janibacter</i> sp.	<i>Terrabacter</i> sp. (EU741152)	1,000	pečena plaža
			n.i. <i>Janibacter</i> sp. (FN582323)	1,000	črevesna vsebina gojenih morskih konjičkov ( <i>Hippocampus guttulatus</i> )
			<i>Terrabacter</i> sp. (DQ060379)	0,997	arktični morski sediment
			<i>Intrasporangiaceae</i> bakterija (EF065608)	0,989	z Agent Orange in herbicidi kontaminirana zemlja
			<i>Janibacter</i> sp. (AY769994)	0,935	bakterija, ki razgrajuje dibenzofuran
W	P6a-W1	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp. (DQ350882)	0,992	vrtna zemlja (bakterija, ki razgrajuje ksantan)
			<i>Microbacterium</i> sp. (DQ785816)	0,958	bakterija, ki razgrajuje 4-klorobenzojsko kislino
			n.i. (DQ814775)	0,946	prebavni trakt gojene zebriče ( <i>Danio rerio</i> )
			<i>Microbacterium</i> sp. (FJ999574)	0,940	spužva ( <i>Haliclona simulans</i> )
			<i>Microbacterium</i> sp. (GQ284466)	0,940	vodni vzorec
S	P4-S3	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp. (GU223092)	0,995	morsko dno
			Izolat (AF125112)	0,969	voda
			n.i. aktinobakterija (EU626187)	0,965	tla
			n.i.; (EU418702)	0,951	blato iz čistilne naprave
			n.i. aktinobakterija (GQ144781)	0,950	morska spužva (Kitajsko morje)

Gojišče	Izolat	Klasifikacija (gis)	Najbolj podobna zaporedja v bazi podatkov	Vrednosti podobnosti	Vir
Z	P3-Z5	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp. (EF016520)	0,976	jezerska voda
			<i>Microbacterium</i> sp. (EF600004)	0,959	vrtna prst
			n.i. (EU149115)	0,952	črevo larve ( <i>Agrilus planipennis</i> )
			n.i. <i>Actinobacterium</i> (EU140909)	0,951	morska spužva ( <i>Hymeniacidon perleve</i> )
Z	P3-Z6	<i>Microbacterium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp. (AB192362)	0,946	jezerska voda
			n.i. (FJ932396)	0,921	jezero Taal (Filipini)
			<i>Microbacterium</i> sp. (AB266564)	0,919	dinoflagelat
			<i>Microbacterium</i> sp. (DQ530119)	0,918	rizosfera ( <i>Glycine max</i> )
			n.i. (AB483195)	0,911	sojino steblo ( <i>Glycine max</i> )
X	P5-X1	<i>Mycobacterium</i> sp.	<i>Microbacterium</i> sp. (AF489290)	0,907	spužva ( <i>Verongida</i> sp.)
			<i>Mycobacterium fortuitum</i> (AY509249)	0,981	želva ( <i>Trionyx sinensis</i> )
			<i>Mycobacterium fortuitum</i> (AY513242)	0,981	siamska bojna ribica ( <i>Betta splendens</i> )
			<i>Mycobacterium farcinogenes</i> (AF055333)	0,979	/
			<i>Mycobacterium conceptionense</i> (AM884286)	0,979	/
			<i>Mycobacterium fortuitum</i> (EU741213)	0,974	peščena plaža (Kostarika, Srednja Amerika)

n.i. ...neizolirana bakterija; /...vir izolacije ni podan; PAH...policiklični aromatski ogljikovodiki

### 4.3 FENOTIPSKA OPREDELITEV BAKTERIJSKIH IZOLATOV

Devetnajst bakterijskih izolatov, ki smo jih izbrali na podlagi zanimive ter edinstvene morfologije ali/in domnevne prisotnosti na vsaj treh različnih gojiščih smo v nadaljevanju naloge natančneje fenotipsko opredelili. Pigmentiranost kolonij, rezultati barvanja po Gramu, mikromorfološki opis, rast pri temperaturi 37°C ter hemolitična, celulazna in hitinolitična aktivnost bakterijskih izolatov iz navadnega prašička *P. scaber* so prikazani v **Preglednici 8**.

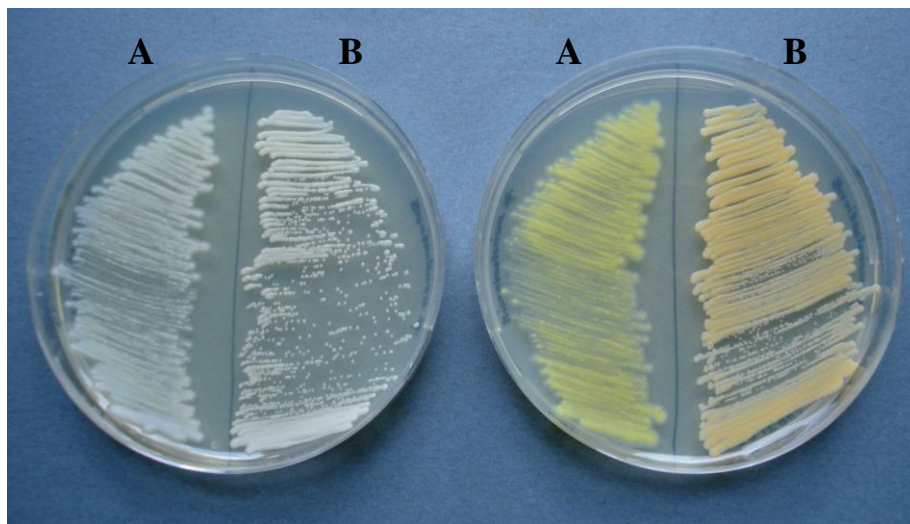
#### 4.3.1 Rast pri temperaturi 37°C

Rast pri temperaturi 37°C na trdnih gojiščih po LB smo opazili pri osmih izolatih (*Ochrobactrum* sp. P3-V1, *Enhydrobacter* sp. P6a-Z1, *Staphylococcus* sp. P7a-A16 in P3-E2, *Leucobacter* sp. P7a-A4, *Micrococcus* sp. P2-S5 ter *Microbacterium* sp. P6a-W1 in P3-Z6). Pri izolatih *Staphylococcus* sp. P7a-A16 in P3-E2 ter *Micrococcus* sp. P2-S5 smo pri 37°C opazili nekoliko hitrejšo rast bakterijskih kolonij kot pri običajni temperaturi gojenja (22°C). Drugi izolati (vsi predstavniki rodu *Stenotrophomonas*: P7a-A1, P4-X3, P4-X6, P6a-Z3, P6a-Z4, izolat *Brevibacterium* P3-Z2, *Janibacter* P2-V2, *Mycobacterium* P5-X1 ter *Ochrobactrum* P4-X5) pri temperaturi 37°C niso rastle ali pa so bile njihove kolonije maloštevilne.

#### 4.3.2 Fotokromogenost

Bakterijski izolati *Ochrobactrum* sp. P3-V1 in P4-X5, *Staphylococcus* sp. P7a-A16, *Leucobacter* sp. P7a-A4, *Janibacter* sp. P2-W2 in *Mycobacterium* sp. P5-X1 niso tvorili pigmenta; njihove kolonije so bile bele ne glede na svetlobne razmere inkubacije. Tvorbo pigmentov (fotokromogenost) smo opazili pri izolatih *Brevibacterium* sp. P3-Z2 ter *Microbacterium* sp. P6a-W1, P3-Z6 in P3-Z5. Kolonije so bile po inkubaciji v temi neobarvane oziroma bele, izpostavljenost svetlobi pa je povzročila tvorbo oranžnega oziroma rumenega pigmenta (**Slika 2**). Skotokromogeni bakterijski izolati so tvorili pigment neodvisno od svetlobnih razmer, v katerih smo jih inkubirali; kolonije petih sevov iz rodu *Stenotrophomonas* (P7a-A1, P4-X3, P4-X6, P6a-Z3 in P6a-Z4) so bile svetlo

rumeno obarvane, kolonije izolatov *Enhydrobacter* sp. P6a-Z1 in *Staphylococcus* sp. P3-E2 svetlo rjave oziroma oranžne, kolonije sevov *Micrococcus* sp. P2-S5 ter *Microbacterium* sp. P4-S3 pa izrazito rumene barve.



**Slika2:** Fotokromogenost bakterijskih izolatov iz črevesa navadnega prašička (*P.scaber*) (A...*Microbacterium* sp. P6a-W1; B...*Brevibacterium* sp. P3-Z2; plošča na levi je bila inkubirana v temi, plošča na desni pa na svetlobi)

**Preglednica 8:** Pigmentiranost kolonij, rezultati barvanja po Gramu, mikromorfološki opis, rast pri temperaturi 37°C ter hemolitična, celulolitična in hitinolitična aktivnost bakterijskih izolatov iz navadnega prašička (*P. scaber*).

Izolat	Pigmentiranost kolonij	Gram	Mikromorfološki opis	Rast pri 37°C	Hemoliza	Hidroliza CMC	Hidroliza CH
<i>Ochrobactrum</i> sp. P3–V1	–	–	majhne podaljšane kroglaste oblike v skupkih	+	–	++	–
<i>Ochrobactrum</i> sp. P4–X5	–	–	majhne podaljšane kroglaste oblike	–	–	+++	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P7a–A1	svetlo oranžna	–	kratke paličice, posamične in v parih	–	+	–	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P4–X3	Svetlo rumena	–	kratke paličice, posamične in v krajših verigah	–	–	+	+
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P4–X6	Svetlo rumena	–	kratke, ravne paličice; posamično ali v skupkih	–	–	–	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P6a–Z3	Svetlo rumena	–	kratke, ravne paličice; posamično ali v skupkih	–	–	+	–
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P6a–Z4	Svetlo rumena	var	podaljšane kroglaste oblike	–	–	–	–
<i>Enhydrobacter</i> sp. P6a–Z1	svetlo rjava	–	pravilne kroglaste celice v parih v ovojnici	+	–	+	–
<i>Staphylococcus</i> sp. P7a–A16	–	+	pravilne kroglaste celice v skupkih	+	–	++	–
<i>Staphylococcus</i> sp. P3–E2	svetlo oranžna	+	pravilne kroglaste celice v skupkih	+	–	++	–
<i>Leucobacter</i> sp. P7a–A4	–	var	kroglaste oblike, kratke paličice posamično, v kratkih verigah	+	+	–	–
<i>Micrococcus</i> sp. P2–S5	rumena	+	pravilne kroglaste oblike v tetradah in skupkih	+	–	++	–
<i>Brevibacterium</i> sp. P3–Z2	oranžna <sup>a</sup>	+	kratke paličice	–	–	++	–
<i>Janibacter</i> sp. P2–W2	–	+	podaljšane kroglaste oblike, posamično, občasno v nepravilnih gručah	–	–	+	–
<i>Microbacterium</i> sp. P6a–W1	rumena <sup>a</sup>	+	kroglaste in kratke paličaste oblike	+	–	++	–
<i>Microbacterium</i> sp. P4–S3	rumena	+	kratke paličice, skupki	+/-	–	+	–
<i>Microbacterium</i> sp. P3–Z5	rumena <sup>a</sup>	+	kratke paličice, skupki	+/-	–	+++	–
<i>Microbacterium</i> sp. P3–Z6	rumena <sup>a</sup>	+	posamične kratke paličice, v verigi	+	–	++	–
<i>Mycobacterium</i> sp. P5–X1	–	šibko+/neob.	drobne kroglaste oblike v verižicah; filamenti	–	–	–	–

Pigmentiranost kolonij: –...ni pigmenta, <sup>a</sup>...fotoinduktivna produkcija pigmenta (fotokromogenost); Gram...barvanje po Gramu: + (–)... celice se barvajo po Gramu pozitivno (negativno), var...celice se barvajo po Gramu spremenljivo, šibko+/neob. ...celice se barvajo po Gramu šibko pozitivno oz. se ne barvajo; Rast pri 37°C: + (–)...rast (ni rasti), +/-... šibka rast; Hemoliza: + (–)... hemoliza (ni hemolize); Hidroliza CMC (karboksimetil celuloze); velikost neobarvanega polja: +...do 5 mm, ++...0,5 mm-1 cm, +++...>1 cm, –...ni hidrolize; Hidroliza CH (hitina): + (–)...hidroliza (ni hidrolize)

### 4.3.3 Hemolitična aktivnost

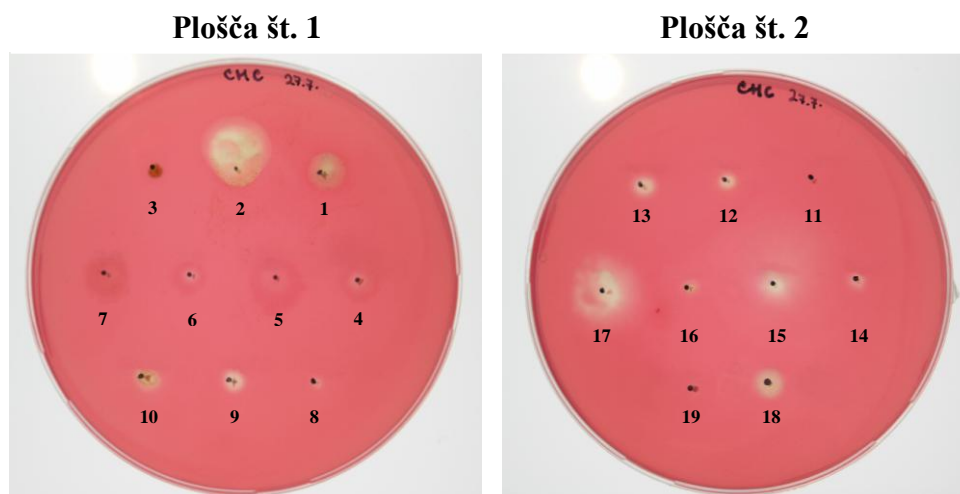
Pri devetnajstih izolatih smo pojav lize govejih eritrocitov na plošči krvnega agarja opazili le okoli kolonij sevov *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 in *Leucobacter* sp. P7a-A4.  $\beta$  – hemoliza (t. j. popolna liza eritrocitov, ki jo ponazarja prosojna cona) se je razvila šele po 96-tih oz. 130-tih urah inkubacije pri 22°C. Hemolitične aktivnosti, omejene le na področje pod kolonijo, ki je lahko zaradi dolgega inkubacijskega časa posledica metabolnih produktov, nismo upoštevali. Izolat *Stenotrophomonas* sp. P6a-Z3 tudi po večkratnem nacepljanju na plošči krvnega agarja ni rasel.

### 4.3.4 Celulazna in hitinolitična aktivnost

Sposobnost ekstracelularne razgradnje CMC-celuloze je imela večina bakterijskih izolatov. Neobarvana območja okoli oz. pod kolonijami preiskovanih sevov, ki so pomenila hidrolizo celuloze, so bila različno velika. Največje neobarvano območje (premera 1 cm) in s tem celulazno aktivnost smo opazili pri izolatih *Ochrobactrum* sp. P4-X5 in *Microbacterium* sp. P3-Z5. Le nekaj milimetrov veliko neobarvano polje ali polje vidno šele po odstranitvi bakterijske kolonije je bilo opaziti pri naslednjih izolatih: *Stenotrophomonas* sp. P4-X3, P6a-Z3, *Enhydrobacter* sp. P6a-Z1, *Janibacter* sp. P2-W2 in *Microbacterium* sp. P4-S3. Izolati *Ochrobactrum* sp. P3-V1, *Staphylococcus* sp. P7a-A16 in P3-E2, *Micrococcus* sp. P2-S5, *Brevibacterium* sp. P3-Z2, *Microbacterium* sp. P6a-W1 ter P3-Z6 so imeli nekoliko večjo sposobnost hidrolize CMC-celuloze (premer neobarvanega polja manj kot 5 mm). Le pet izolatov, trije so pripadali rodu *Stenotrophomonas* sp. (P7a-A1, P4-X6, P6a-Z4), *Leucobacter* sp. P7a-A4 ter *Mycobacterium* sp. P5-X1 CMC-celuloze.

**Slika 3** prikazuje celulazno aktivnost devetnajst bakterijskih izolatov.





**Slika 3:** Celulazna aktivnost bakterijskih izolatov iz črevesa navadnega prašička (*P.scaber*) (na plošči gojišča s karboksimetil celulozo št.1 si od desne proti levi sledijo: 1...*Ochrobactrum* P3-V1; 2...*Ochrobactrum* P4-X5; 3...*Stenotrophomonas* P7a-A1; 4...*Stenotrophomonas* P4-X3; 5...*Stenotrophomonas* P4-X6; 6...*Stenotrophomonas* P6a-Z3; 7...*Stenotrophomonas* P6a-Z4; 8...*Enhydrobacter* P6a-Z1; 9... *Staphylococcus* P7a-A16; 10...*Staphylococcus* P3-E29; na plošči gojišča s karboksimetil celulozo št.2 si od desne proti levi sledijo: 11...*Leucobacter* P7a-A4; 12...*Micrococcus* P2-S5; 13...*Brevibacterium* P3-Z2; 14...*Janibacter* P2-W2; 15...*Microbacterium* P6a-W1; 16...*Microbacterium* P4-S3; 17...*Microbacterium* P3-Z5; 18...*Microbacterium* P3-Z6; 19...*Mycobacterium* P5-X1) Hidroliza celuloze je vidna kot neobarvano območje.

Sposobnost razgradnje koloidnega hitina smo opazili le pri izolatu *Stenotrophomonas* P4-X3. Kolonija izolata je po štirinajstdnevni inkubaciji pri 22°C dosegla velikost 1,5 cm; zbistritvena cona pa 1 cm. (Slika 4).



**Slika 4:** Sposobnost razgradnje hitina bakterijskega izolata *Stenotrophomonas* sp. P4-X3 (kolonija levo spodaj) (hidrolizo hitina ponazarja zbitritvena cona v sicer motnem gojišču)

#### 4.3.5 Občutljivost za protimikrobne snovi

Občutljivost posameznih bakterijskih izolatov za protimikrobne snovi je prikazana v **Preglednici 9**. Vsi izolati so bili občutljivi za rifampin; premer inhibicijske cone sevov *Ochrobactrum* sp. P4-X5 in *Staphylococcus* sp. P7a-A16 je meril več kot 6 cm.

Med najbolj občutljive lahko na podlagi rezultatov uvrstimo seve *Enhydrobacter* sp. P6a-Z1 ter tri predstavnike rodu *Microbacterium*, t.j. seve P6a-W1, P3-Z5 in P3-Z6. Med najbolj odporne pa sodijo po Gramu negativni predstavniki rodu *Ochrobactrum* sp. P3-V1 in P4-X5 ter sevi iz rodu *Stenotrophomonas* P7a-A1, P4-X3, P4-X6, P6a-Z3 ter P6a-Z4.

Večina izolatov je bila občutljivih za ciprofloksacin ali pa odpornosti proti oz. občutljivosti za ciprofloksacin nismo mogli določiti. Vsi predstavniki rodov *Ochrobactrum* (seva P3-V1 in P4-X5) in *Stenotrophomonas* (sevi P7a-A1, P4-X3, P4-X6, P6a-Z3 in P6a-Z4) ter sevi *Micrococcus* sp. P2-S5, *Brevibacterium* sp. P3-Z2 ter *Janibacter* sp. P2-W2 so bili odporni proti trimetoprimu. Zadnji trije so bili skupaj z izolati *Enhydrobacter* sp. P6a-Z1, *Staphylococcus* sp. P7a-A16 in *Microbacterium* sp. P3-Z6 občutljivi tudi za eritromicin. Predstavniki rodov *Ochrobactrum* sp. in *Stenotrophomonas* sp. ter *Brevibacterium* sp. P3-Z2, *Janibacter* sp. P2-W2 in *Mycobacterium* sp. P5-X1 so bili odporni proti  $\beta$ -laktamskima antibiotikoma ampicilinu in penicilinu medtem, ko sta bila izolata *Micrococcus* sp. P2-S5 ter *Microbacterium* sp. P3-Z5 občutljiva za oba omenjena antibiotika. Le trije izolati, in

sicer *Ochrobactrum* sp. P3-V1, *Leucobacter* sp. P7a-A4 ter *Microbacterium* sp. P4-S3 so bili odporni proti streptomycinu.

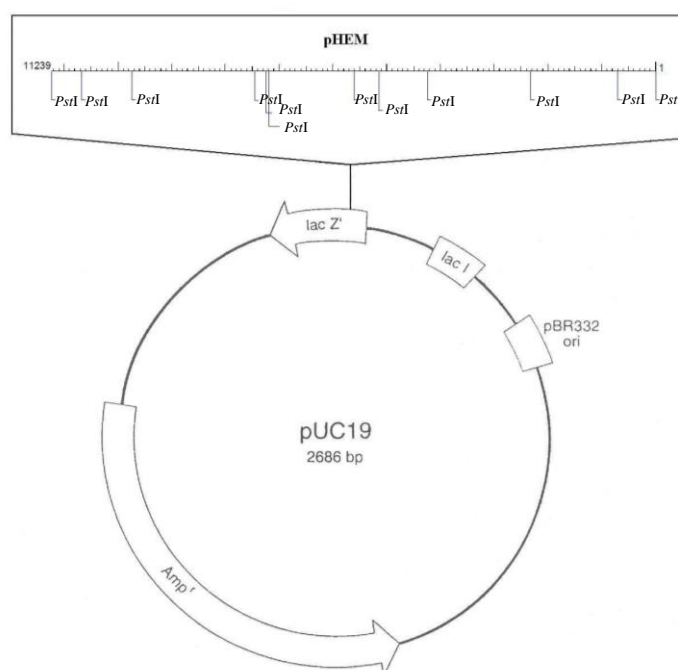
**Preglednica 9:** Občutljivost za protimikrobne snovi bakterijskih izolatov iz zadnjega črevesa navadnega prašička *P. scaber* (RA-15...rifampin 15 µg, CIP-5...ciprofloxacim 5 µg, TMP-5...trimetoprim 5 µg, E-2...eritromicin 2 µg, S-10...streptomycin 10 µg, AM-10...ampicilin 10 µg, P-10...penicilin 10 U)

Izolat	RA-15	CIP-5	TMP-5	E-2	S-10	AM-10	P-10
<i>Ochrobactrum</i> sp. P3-V1	S	S	R	R	R	R	R
<i>Ochrobactrum</i> sp. P4-X5	S	S	R	R	S	R	R
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P7a-A1	S	S	R	I	I	R	R
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P4-X3	S	S	R	R	S	R	R
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P4-X6	S	S	R	R	S	R	R
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P6a-Z3	S	I	R	R	I	R	R
<i>Stenotrophomonas</i> sp. P6a-Z4	S	I	R	R	I	R	R
<i>Enhydrobacter</i> sp. P6a-Z1	S	S	S	S	S	S	I
<i>Staphylococcus</i> sp. P7a-A16	S	S	S	S	S	R	I
<i>Staphylococcus</i> sp. P3-E2	S	S	S	R	S	S	R
<i>Leucobacter</i> sp. P7a-A4	S	I	S	R	R	S	R
<i>Micrococcus</i> sp. P2-S5	S	S	R	S	S	S	S
<i>Brevibacterium</i> sp. P3-Z2	S	I	R	S	I	R	R
<i>Janibacter</i> sp. P2-W2	S	S	R	S	S	R	R
<i>Microbacterium</i> sp. P6a-W1	S	S	S	I	S	S	I
<i>Microbacterium</i> sp. P4-S3	S	I	I	I	R	S	R
<i>Microbacterium</i> sp. P3-Z5	S	S	S	I	S	S	S
<i>Microbacterium</i> sp. P3-Z6	S	S	S	S	S	S	I
<i>Mycobacterium</i> sp. P5-X1	S	S	I	R	S	R	R

R...odporen, S...občutljiv, I...intermediaren (nedoločljivo)

#### 4.4 GENETSKA OPREDELITEV ZAPISA ZA HEMOLITIČNO AKTIVNOST IZOLATA *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1

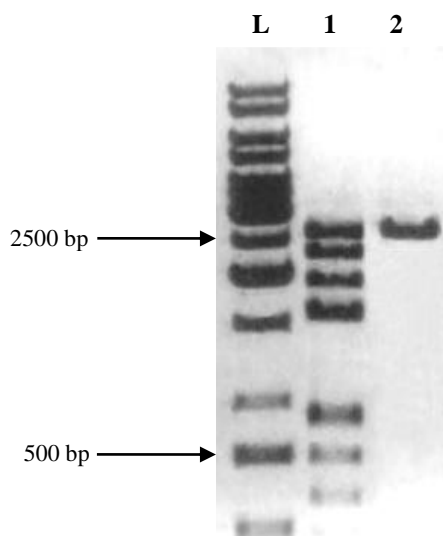
##### 4.4.1 Kloniranje in analiza nukleotidnega zaporedja regije, ki kodira hemolitično aktivnost



**Slika 5:** Plazmidni vektor pUC19 z 11,3 kbp dolgim vključkom kromosomske DNA izolata *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1

Med pregledovanjem in iskanjem rekombinantnih transformant z zapisom za hemolitično aktivnost na gojiščih krvnega agarja z Ap smo cono lize eritrocitov po 24-urni inkubaciji pri 37°C opazili le okoli kolonije klona, ki smo ga poimenovali pHEM. Neobarvane kolonije klona, ki so zrasle po nacepiti na ploščah gojišča LB z Ap in X-Gal so potrdile prisotnost rekombinantnega plazmida. Velikost DNA vključka klona pHEM smo ugotovili z agarozno gelsko elektroforezo s *PstI* rezane plazmidne DNA (**Slika 6**). Ugotovili smo, da je vključek dolg približno 11,3 kbp. Nukleotidno zaporedje DNA vključka (Priloga B) smo

ugotovili s sekvenciranjem s postopkom sprehajanja z začetnimi oligonukleotidi (*ang.* "primer walking") (Švica).



**Slika 6:** Elektroforetska ločitev fragmentov plazmidne DNA klona pHEM po restrikciji z restriktazo *PstI* (od leve proti desni si sledijo: L...1 kb lestvica, 1...s *PstI* rezana plazmidna DNA pHEM; 2...s *PstI* rezana plazmidna DNA vektorja pUC19)

11239 bp dolgo nukleotidno zaporedje vključka pHEM vsebuje 11 popolnih odprtih bralnih okvirjev *orf* (*ang.* open reading frame): *orfA1*, *orfA2*, *orfA3*, *orfA4* (bralni okvir +1); *orfB1*, *orfB3* (bralni okvir +2); *orfC1*, *orfC2*, *orfC3* (bralni okvir +3); *orfF1* in *orfF2* (bralni okvir -3; komplementarna DNA veriga) ter delni odprti bralni okvir *orfB2* (**Preglednica 10**). Predvideni *orf*-i niso tesno kolinearno organizirani – dve večji nekodirajoči regiji sta med *orfA2* in *orfC1* (588 bp) ter *orfB3* in *orfF2* (803 bp).

*OrfA1* in *orfB1* se delno prekrivata za 355 nukleotidov (**Slika 7**). Njuni homologi v bazah podatkov so iz sevov *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3, *S. maltophilia* K279a in *Stenotrophomonas* sp. SKA14.

Med primerjavo kodirajočih regij z zaporedji v bazi podatkov GenBank se je pokazalo, da je prišlo do napačne religacije dveh *PstI* fragmentov kromosomske DNA seva *Stenotrophomonas* P7a-A1. Tako je 11,3 kbp dolg fragment v resnici sestavljen iz dveh nekolinearnih delov velikosti 5612 bp ter 5627 bp (prepoznavno mesto za *PstI* v fragmentu pHEM je na poziciji 5147/5143 v smeri 5'→3' kodirajoče verige).

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, 2010

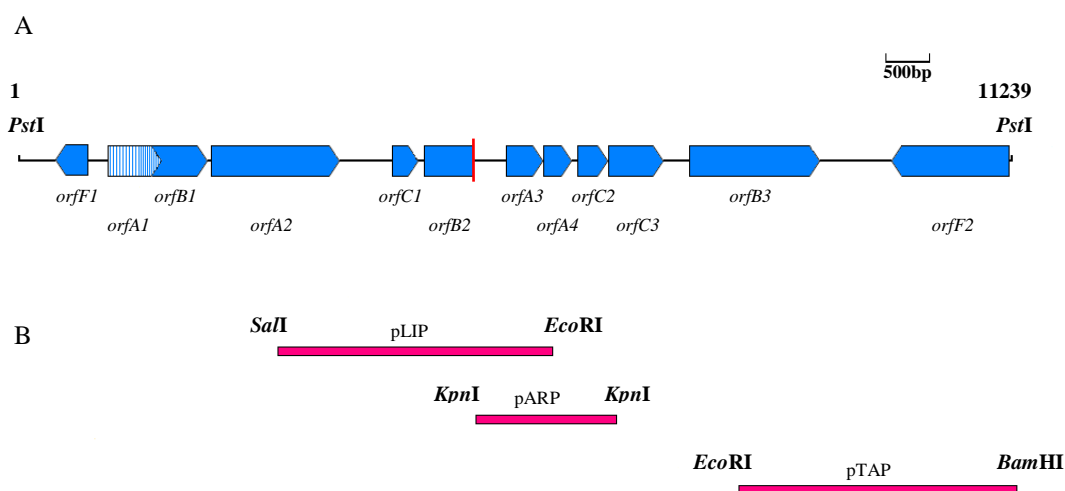
**Preglednica 10:** Analiza 11239 bp dolgega nukleotidnega zaporedja pHEM (*orf*...odprti bralni okvir; mesto nt...mesto v nukleotidnem zaporedju (v oklepaju so navedeni alternativni iniciacijski kodoni); število aa...število kodirajočih aminokislin) ter rezultati primerjave BLAST (homologni protein; številka v bazi proteinskih zaporedij UniProtKB oz. GenBank (homologni proteini *Stenotrophomonas* sp. SKA14) in odstotek podobnosti)

<i>Orf</i>	Mesto nt	Število aa	Homologni protein	Številka v banki	Organizem	% podobnosti
<i>orfF1</i>	411-779	122	signalna transdukcijska histidinska kinaza	Q025Y3	<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	44
			domneven protein	EAQ55833.1	<i>Vibrio</i> sp. MED222	38
			dvokomponentni senzor histidinske kinaze	EED25688.1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 16	40
<i>orfA1</i>	1009-1614	201	RNA-metil transferaza	EED41037.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.SKA14	80
			ohranjen domnevni protein	B2FLW3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	80
			metiltransferaza	B4SS15	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	77
<i>orfB1</i>	1343-2131	262	pantetein-fosfat adenililtransferaza	B4SS16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	92
			fosfopanteteinofosfat adenililtransferaza	B2FLW4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	91
			domnevni fosfopanteteinofosfat adenililtransferaza	CBA16429	<i>Xanthomonas albilineans</i>	88
<i>orfA2</i>	2176-3636	486	eksinukleaza ABC, podenota B	EED39542.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	90
			eksinukleaza ABC, podenota B	B4SQN5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	90
			eksinukleaza ABC, podenota B	B0RRD9	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. B100	89
<i>orfC1</i>	4224-4532	102	NLP/P60	B4SQZ1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	90
			lipoprotein	EED38966.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	89
			domnevni lipoprotein	B2FP30	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	89
<i>orfB2</i>	4601-5362	253	zunanj membranski lipoprotein	EED38969.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	72
			NLP/P60	B4SQZ2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	73
			hidrolaza v celični steni	B2FP31	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	88
<i>OrfA3</i>	5518-5934 (GTG)	138	AtsE	EED39968.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	74
			domnevni protein	B4SKZ9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	73
			domnevni ARP protein	B2FTQ6	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	72
<i>orfA4</i>	5938-6261	107	tioredoksinaska domena	B4SKZ8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	67
			domnevni tioredoksin	B2FTQ5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	68
			tioredoksin	Q8PR57	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i> str.306	58
<i>orfC2</i>	6324-6674	116	domnevni protein	B2FTR0	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	79
			domnevni protein	B4SL04	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	78
			ohranjen domnevni protein	EED40506	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	77
<i>orfC3</i>	6678-7304 (GTG)	208	domnevni protein	B4SL03	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	77
			ohranjen domnevni protein	EED37153.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.SKA14	76
			domnevni protein	B2FTQ9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	76
<i>orfB3</i>	7400-9082	495	prolinski/betainski transporter	EED39093.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	87
			domnevni prolin/betain transporter	B2FTQ7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	87
			splošni substratni transporter	B4SL01	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	86
<i>orfF2</i>	9885-11216 (ATC)	443	protein z domeno TAP	B4SMW4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3	69
			domnevna ekstracelularna proteaza	B2FMJ5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a	68
			cisteinska proteinaza	EED37928.1	<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14	67

AtsE...protein za pritrđitev na gostiteljsko celico, ARP(*angl.* attachment related protein)...prolin, udeležen v pritrjevanju bakt. na gostiteljske celice

Večina *orf*-ov kaže visoko stopnjo homologije z aminokislinskimi zaporedji v bazi podatkov, ki kodirajo produkte velikosti od 102 do 495 aminokislinskih ostankov. Najbolj sorodna zaporedja izvirajo iz endofitske vrste seva *S. maltophilia* R551-3, dušik-fiksirajočega *Stenotrophomonas* sp. SKA-14 ter kliničnega izolata *S. maltophilia* K279a.

Enajst od dvanajstih *orf*-ov je ohranjenih v sevih P7a-A1 ter *S. maltophilia* R551-3, K279a in *Stenotrophomonas* sp. SKA14. Izjema je le *orfF1*, ki kodira 122 aminokislinskih ostankov velik produkt in se le delno ujema s histidinsko kinazo seva *Solibacter usitatus* Ellin6076 (44%) oz. *Vibrio parahaemolyticus* 16 (40%).



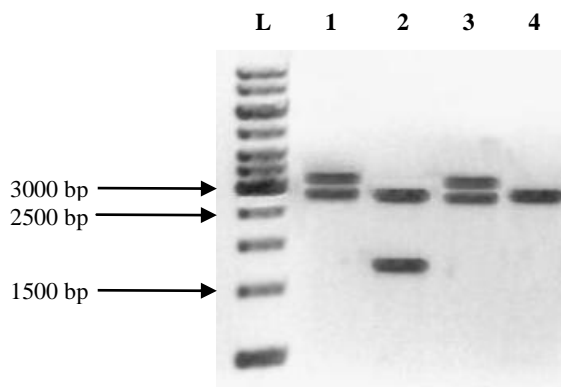
**Slika 7: A** Predvideni odprti bralni okvirji DNA vključka pHEM. *OrfA1* (označen z navpičnimi redkimi modrimi črtami) in *orfB1* se prekrivata (prekrivajoče mesto ponazarjajo navpične goste modre črte) (*orfB1* se prekrivata (prekrivajoče mesto ponazarjajo navpične goste modre črte) (rdeča navpična črta ponazarja mesto v nukleotidnem zaporedju, kjer je prišlo do napačne religacije dveh DNA fragmentov)

**B** Shematski prikaz subkloniranja 11,3 kbp DNA fragmenta (rožnato obarvani pravokotniki ponazarjajo izbrane DNA fragmente, nastale po restrikciji z ustreznimi pari restriktaz, kot je prikazano na sliki, in vstavljene v plazmidni vektor pUC19)

#### 4.4.2 Subkloniranje

Med homolognimi proteini v bazi podatkov nismo odkrili hemolizina oziroma proteinov s citolitično funkcijo. Da bi ugotovili, kateri del kodirajočega zaporedja pHEM posreduje hemolitično aktivnost *E.coli* DH5, smo 11,3 kbp DNA fragment subklonirali. Izbrane fragmente DNA, nastale po restrikciji 11,3 kbp DNA vključka z restrikcijskimi edonukleazami *Bam*HI-*Eco*RI (3,1 kbp) (mesto v nukleotidnem zaporedju pHEM: 8130-11239 in del poliklonskega mesta vektorja pUC19 od prepoznavnega mesta za restriktazo *Pst*I do prepoznavnega mesta za *Bam*HI), *Sal*I-*Eco*RI (3,1 kbp) (mesto v nukleotidnem zaporedju pHEM: 2906-6019) ter *Kpn*I (1,6 kbp) (mesto v nukleotidnem zaporedju pHEM: 5122-6739) smo po ločitvi z agarozno gelsko elektroforezo klonirali v plazmidni vektor pUC19 in vnesli v celice *E.coli* DH5. Restrikcija izolirane plazmidne DNA iz posameznih rekombinantnih klonov z ustreznimi restriktazami je potrdila prisotnost DNA vključkov ustrezne velikosti, to je 3,1 kbp velik fragment *Bam*HI-*Eco*RI v klonu pTAP, 3,1 kbp velik fragment *Sal*I-*Eco*RI v klonu pLIP ter 1,6 kbp velik fragment *Kpn*I v klonu pARP.

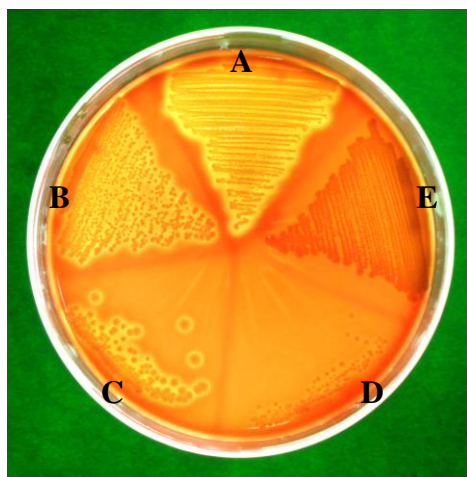
**Slika 7B** prikazuje shemo subkloniranja 11,3 kbp dolgega fragmenta pHEM.



**Slika 8:** Elektroforetska ločitev fragmentov DNA, nastalih po restrikciji z ustreznimi restriktazami oz. pari restriktaz (od leve proti desni si sledijo: **L**...1 kb lestvica; **1**...plazmidna DNA pLIP, rezana z *Eco*RI in *Sal*I; **2**... plazmidna DNA pARP, rezana s *Kpn*I; **3**... plazmidna DNA pTAP, rezana z *Bam*HI in *Eco*RI; **4**... plazmidni vektor pUC19, rezan s *Kpn*I)



Pri klonih pLIP in pTAP smo po 30 oz. 40 urah inkubacije pri 37°C zasledili hemolitično aktivnost na gojiščih s krvnim agarjem z Ap, vendar je bila cona lize eritrocitov okoli posameznih kolonij obeh klonov manjša in manj izrazita v primerjavi s klonom pHEM. Klon pARP z 1,6 kbp velikim DNA vključkom na plošči krvnega agarja z Ap ni imel hemolitične aktivnosti.



**Slika 9:** Hemoliza klona pHEM (A) in subklonov pTAP (B) ter pLIP (C) na krvnem agarju z ampicilinom (D...nehemolitičen fenotip klona pARP; E...negativna kontrola; nerekombinanten pUC19 v celicah *E. coli* DH5)

1618 bp velik fragment *Kpn*I subklona pARP vsebuje tri popolne *orf*-e: *orfA3*, *orfA4* ter *orfC2*, ki ne posredujejo hemolitične aktivnosti klona pHEM. 138 aminokislinskih ostankov velik produkt *orfA3* je homologen proteinom, udeleženi v pritrdjevanju bakterij na gostiteljske celice, in sicer 74% *AtsE Stenotrophomonas* sp. SKA14; 73% domnevemu proteinu seva *S. maltophilia* R551-3 ter 72% ARP seva *S. maltophilia* K279a. *OrfA4* ter *orfC2* kodirata produkta s 107 oz. 116 aminokislinskimi ostanki, ki sta sorodna tioredoksinjski domeni seva *S. maltophilia* R551-3 (67% stopnja identičnosti) (tioredoksinu seva K279a (68%) oz. tioredoksinu seva *Xanthomonas axonopodis* pv. citri str. 306 (58%)) oz. proteinu z ohranjeno domeno PhdYeFM z neznano funkcijo.

Subklon pLIP *Sall-Eco*RI poleg delnega *orfB2* in zapisa za protein, ki je udeležen v pritrdjevanju na gostiteljske celice (*orfA3*) (ki je prisoten tudi na klonu pARP), kodira tudi

102 aminokislinskih ostankov velik polipeptid (*orfC1*) z visoko stopnjo identičnosti s proteinom NLP/P60 seva *S. maltophilia* R551-3 (90%) oz. lipoproteinom seva *Stenotrophomonas* sp. SKA14 (89%) in seva K279a (89%). 253 aminokislinskih ostankov velik produkt delnega *orfB2* je podoben lipoproteinu v zunanji membrani seva *Stenotrophomonas* sp. SKA14 (72%) oz. proteinu NLP/P60 seva *S. maltophilia* R551-3 (73%) ter hidrolazi v celični steni seva K279a (88%). Ohranjeni domeni NLP/P60 in COG0791 najdemo v številnih lipoproteinih in hidrolazah v celični steni bakterij, povezanih z invazijo v gostiteljske celice. Predvidevamo, da je sposobnost lize eritrocitov kodirana z *orfC1* ali pa *orfB2* (kljub napačni ligaciji fragmentov in posledično verjetne prisotnosti le delnega *orf*-a ne vemo, ali je protein nefunkcionalen), saj klon pARP, ki prav tako vsebuje *orfA3*, ni hemolitičen.

3110 bp dolgo nukleotidno zaporedje klona pTAP *EcoRI-BamHI* predvidoma kodira del proteina, homolognega prolinskemu/betainskemu transporterju (*orfB3*) ter 443 aminokislinskih ostankov velik polipeptid (*orfF2*), ki verjetno posreduje hemolizo subklona pTAP. Njegovi homologi v bazi aminokislinskih zaporedij so protein z domeno TAP seva *S. maltophilia* R551-3 (69% stopnja homologije) oz. ekstracelularna proteaza seva *S. maltophilia* K279a z iminopeptidazno aktivnostjo (68% stopnja homologije) oz. cisteinska proteinaza seva *Stenotrophomonas* SKA14 (67% stopnja homologije). Ohranjena domena COG0596 je prisotna v številnih hidrolazah oziroma aciltransferazah; protein z domeno TAP pa je del družine esteraz in lipaz, ki cepijo estrske vezi.

Primarne funkcije homologov (določene na podlagi homologije ali izolacije in opredelitve proteinov) produktov *orfC1*, *orfB2* in *orfF2*, ki glede na rezultate subkloniranja posredujejo hemolizo celicam *E.coli* DH5 in predvidoma sevu *Stenotrophomonas* P7a-A1, še niso bile povezane s citolitično aktivnostjo.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Izolacija in identifikacija bakterijskih izolatov

S tradicionalnimi mikrobiološkimi in nekaterimi preprostejšimi fenotipskimi metodami smo skušali opredeliti izolate iz zadnjega črevesa kopenskega raka enakonožca *P. scaber*. Za izolacijo bakterij smo uporabili različna agarizirana gojišča, katerih osnova je temeljila na gojiščih za mikoplazme, ki smo jim dodali različne volumne bogatitve s konjskim oz. humanim serumom. S tem smo poskušali povečati uspešnost izolacije paličastih mikoplazem, do sedaj opredeljenih le z molekularno biološkimi metodami. Te zaobidejo vse omejitve tradicionalnih mikrobioloških metod in teoretično zajamejo vse predstavnike mikrobnih združb (tradicionalne metode pa praviloma manj kot 1%) in so zato primernejše za raziskave raznolikosti in strukture združbe (Steven in sod., 2007). Tradicionalne metode, ki temeljijo na osamitvi in gojenju mikroorganizmov, so resda dolgotrajne, a na drugi strani omogočajo njihovo izolacijo in izvedbo preiskav, ki vodijo v razumevanje fiziologije in genetike le-teh. Paličastih bakterij, pritrjenih na kutikularne trne stene zadnjega črevesa sicer nismo uspeli izolirati, smo pa zato izolirali druge predstavnike črevesne združbe. Morfološko zanimive in edinstvene izolate smo izbrali za nadaljnjo opredelitev in identifikacijo na osnovi analize nukleotidnega zaporedja gena za 16S rRNA.

Devetnajst izbranih izolatov se je uvrstilo v 10 različnih rodov iz treh bakterijskih debel. Osem izolatov je pripadalo debli *Proteobacteria* (*Alpha* ter *Gammaproteobacteria*): predstavnika rodov *Ochrobactrum* in *Enhydrobacter* ter pet izolatov iz rodu *Stenotrophomonas*. V deblo *Actinobacteria* se je uvrstilo devet izolatov in sicer štirje predstavniki iz rodu *Microbacterium* in po en predstavnik rodu *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Janibacter* ter *Mycobacterium*. Deblo po Gramu pozitivnih bakterij z nizko vsebnostjo G+C (*Firmicutes*) sta zastopala le dva izolata iz rodu *Staphylococcus*. Med izbranimi izolati ni nobenega predstavnika črevesne mikrobiote, opisane z molekularno biološkimi metodami, kar pa ni presenetljivo, saj smo najverjetneje izolirali predstavnike t.i. redke biosfere (Pedros-Alio, 2006). S tradicionalnimi mikrobiološkimi

metodami, ki temeljijo na gojenju mikrobov na ali v gojiščih namreč praviloma izoliramo prav te, manjšinske populacije, zato ker je ključni dejavnik njihova sposobnost rasti v laboratorijskih razmerah na ponujenih gojiščih in ne npr. njihova številčnost v preučevanem ekosistemu.

Ko smo iskali podobna nukleotidna zaporedja v zbirki sekvenc 16S rRNA smo ugotovili, da so pripadala neizoliranim bakterijam ali redkeje izolatom, ki so ubikvitarno zastopani v najrazličnejših okoljih. Čeprav nismo uspeli izolirati predstavnika '*Candidatus Bacilloplasma*', je bilo med izbranimi izolati nekaj predstavnikov zanimivih bakterijskih rodov. Odločili smo se, da podrobneje proučimo nekatere fenotipske in genotipske lastnosti teh izolatov in tako prispevamo nova znanja k razumevanju strukture in vloge mikrobne združbe, ki živi v prebavilu navadnega prašička.

### **5.1.2 Fenotipska opredelitev bakterijskih izolatov**

Po nekajtedenskem precepljanju izoliranih bakterijskih sevov smo domnevno čiste kulture barvali po Gramu. Trije izolati so se po Gramu barvali variabilno oz. se niso barvali. Fenotipski test ne omogoča vedno nedvoumnega razlikovanja med grampozitivnimi in gramnegativnimi kulturami bakterij. Nekateri pripadniki po Gramu pozitivnih firmikutov se pogosto barvajo po Gramu variabilno ali pa celo po Gramu negativno, npr. člani vampnega rodu *Butyrivibrio* (Cheng in Costerton, 1977). Morfološke razlike smo opazili med svežimi kulturami, ki so bile običajno v obliki paličic in starejšimi kulturami, ki so bile pogostejše kroglaste oblike. Uporabnost barvanja po Gramu na nepoznanih ali slabo poznanih in neopredeljenih okoljskih vzorcih je tako omejena, zato je gramsko pripadnost nujno potrebno potrditi še z drugimi testi, npr. katalaznim testom s KOH.

Večina izolatov je pri temperaturi 37°C slabo zrasla oz. rasti nismo zaznali. Ker rasti pri drugih temperaturah nismo ugotavljali, izolatov ne moremo opredeljevati glede na njihovo sposobnost rasti pri različnih temperaturah.

Fotoinduktivno produkcijo pigmentov smo opazili pri izolatih *Brevibacterium* sp. P3-Z2 ter *Microbacterium* sp. P6a-W1, P3-Z6 in P3-Z5. Pojav fotokromogenosti – fotoinducibilne produkcije pigmentov je sicer najboljše opisan in raziskan pri

mikobakterijah, a je splošno razširjen fenomen tudi med aktinomicetami, kjer svetloba običajno inducira karotenogenezo. Ločimo dva tipa kromogeneze: prvi je t.i. eukromogeneza oz. sinteza pigmentov *de novo*, drugi pa pseudokromogeneza. Pri slednji se bodisi eksogeni substrat z delovanjem encimov pretvori v pigment (tip I) bodisi se predhodni metabolit v bakteriji pretvori v obarvano ali neobarvano komponento (tip II; t.i. fotokemično obarvanje oz. razbarvanje). Eukromogeneza je lahko inducibilna, kjer kot induktorji služijo svetloba, temperatura ali kemijske spojine ali pa konstitutivna, kjer je pigment vedno prisoten in je lahko pomemben fenotipski znak (Koyama 1991). Fotokromogenost je odvisna še od nekaterih drugih dejavnikov – temperature, kisika in pogojev oz. časa osvetljevanja oz. izpostavljenosti svetlobi. Tako so pri sevih iz rodu *Mycobacterium* opazili razlike v tvorbi pigmenta pri različnih temperaturah inkubacije – večina sevov pri 28°C ni tvorila pigmenta (Tsukamura, 1981). Zato se postavlja vprašanje – ali smo med izbranimi izolati zaradi razmer, v katerih smo fotoinducibilno produkcijo pigmentov testirali, morebiti spregledali še kakšen fotokromogeni izolat.

V nefotosintetskih organizmih fotokromogeni pigmenti običajno ščitijo pred reaktivnimi kisikovimi zvrstmi in s tem organizem pred poškodbami, lahko pa oz. so vključeni v patogenezo (npr. *Staphylococcus aureus*) – ščitijo pred uničujočo fagocitno obrambo.

### 5.1.3 Celulolitična aktivnost

Celuloza – primarni produkt fotosinteze v kopenskih okoljih, je najbolj razširjeni obnovljivi vir, ki nastaja v biosferi (Holtzapfel, 1993; Jarvis, 2003; Zhang in Lynd, 2004b). Skupaj z ligninom in hemicelulozo predstavlja glavno strukturno komponento višjih rastlin (Zhang in sod., 2006). Biološka razgradnja celuloze s celulazami, ki jih proizvajajo mnogi mikroorganizmi predstavlja glavni tok ogljika iz organsko fiksirane oblike v atmosferski CO<sub>2</sub>. (Berner, 2003; Falkowski in sod., 2000; Melillo in sod., 2002).

Celuloza je linearni polimer D-anhidroglukopiranoze, vezane z  $\beta$ -1,4-glikozidnimi vezmi. Ponavljajoča enota celuloze je anhidrocelobioza (Zhang in sod., 2006); število glukozidnih enot je v molekulah celuloze različno, niha pa tudi stopnja polimerizacije. Celuloza je kemično homogena, strukturno pa raznolika – z amorfnimi predeli, kjer celulozne verige niso tesno povezane, in kristaliničnimi območji, kjer vodikove vezi znotraj in zunaj verige

povzročijo nastanek urejene strukture celuloznih mikrofibril. Prav pri slednji gre za obliko polisaharida, ki je najbolj odporna proti encimski razgradnji. (Gilbert in Hazlewood, 1993).

Celulolitični mikrobi v splošnem slabo izrabljajo proteine ali lipide kot vir energije za rast, poleg celuloze pa lahko zkoriščajo oz. razgrajujejo tudi druge ogljikove hidrate, bolj omejene so le anaerobne celulolitične vrste (Sukumaran in sod., 2005). Za izrabo oziroma razgradnjo netopne celuloze celulolitični mikrobi proizvajajo zunajcelične celulaze. V procesu hidrolize sinergistično sodelujejo endoglukanaze, eksoglukanaze ali celobiohidrolaze ter  $\beta$ -glukozidaze (Henrissat, 1994; Knowles in sod., 1987; Lynd in sod., 2002; Teeri, 1997; Wood in Garcia-Campayo, 1990; Zhang in Lynd, 2004b).

Bakterije, ki zaidejo v prebavilo skupaj z zaužito hrano, so za kopenske enakonožce, ki se hranijo z lesom in listno steljo zelo pomembne. Bakterije lahko pomagajo vzdrževati ustrezne razmere v črevesu za razgradnjo (prebavo), so vir nutrientov ali ekstracelularnih encimov. Večina (kar 14 od 19 bakterijskih izolatov) je imela sposobnost razgradnje topne CMC-celuloze, kar do neke mere potrjuje predvidevanja nekaterih avtorjev, da bodisi zaužite bakterije bodisi indigene bakterije v prebavnem traktu s svojimi hidrolitičnimi encimi pomagajo pri razgradnji težko razgradljivih polisaharidov. Navsezadnje, tudi Kostanjšek in sod. (2010), ki so prvi uspešno klonirali in opredelili endogene endo- $\beta$ -1,4-glukanaze v hepatopankreasnih celicah navadnega prašička, ne izključujejo vloge encimov zaužitih bakterij pri razgradnji celuloze oz. sinergističnega sodelovanja tako endogenih kot tudi eksogenih encimov.

#### **5.1.4 Hitinolitična aktivnost**

Hitin, ki je poleg celuloze eden izmed najbolj razširjenih polisaharidov na zemeljski obli, je netopni linearni homopolimer N-acetil- $\beta$ -D-glukozaminskih enot, povezanih z  $\beta$ -1,4 glikozidnimi vezmi (Shahidi in Abuzaytoun, 2005). Je pomembna strukturna komponenta rakov, gliv, praživali in insektov (Flach in sod., 1992), medtem ko ga rastline, vretenčarji in prokarionti ne vsebujejo.

Hitinaze - encime, ki katalizirajo razgradnjo hitina in jih najdemo v mnogih različnih organizmih: virusih, bakterijah, glivah, insektih, višjih rastlinah in živalih, tudi tistih, ki hitina nimajo. Imajo pomembno fiziološko in ekološko vlogo (Cody in sod., 1990; Duo-Chuan, 2006; Gooday, 1990); sodelujejo npr. pri morfogenezi celičnih sten in zunanjih skeletov (Gooday, 1977; Roberts in Selitrennikoff, 1987). Mnoge bakterije, predvsem predstavniki rodov *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio*, *Streptomyces* in *Bacillus* (Cody, 1989) lahko uporabljajo hitin kot vir energije. Nekatere bakterijske hitinaze so pomembne za biološki nadzor rastlinskih bolezni, ki jih povzročajo različne fitopatogene glive (Chernin in sod., 1997; Downing in Thomson, 2000).

Sposobnost razgradnje hitina smo opazili le pri izolatu *Stenotrophomonas* sp. P4-X3. O prisotnosti hitinaz pri bakterijah tega rodu so že poročali in celo klonirali ter molekularno opisali odgovorni gen (Kobayashy in sod., 2002). Hitinaze naj bi skupaj z številnimi metaboliti, kot so maltofilin in ksantobaktin, ki so še posebej pogosto zastopani pri okoljskih izolatih, sodelovale v protiglivnem delovanju tega mikroorganizma in imajo velik biotehnološki potencial.

Vloga oz. prisotnost hitinolitičnih bakterij v črevesu navadnega prašička je nejasna. Morda sodelujejo pri razgradnji hitinskih struktur, ki pokriva zadnje in srednje črevo ter tako pomagajo pri levitvi, ali pa podobno kot v rizosferi sodelujejo pri nadzoru patogenih mikroorganizmov, t.j. gliv v črevesu.

### **5.1.5 Hemolitična aktivnost**

Hemolizo govejih eritrocitov na krvnem agarju smo opazili le pri 2 izolatih, uvrščenih v rod *Leucobacter* (v literaturi o njegovi hemolitični naravi ne poročajo) in enem od petih izolatov iz rodu *Stenotrophomonas*.

Predstavniki rodu *Stenotrophomonas* so navzoči v izjemno raznovrstnih okoljih in geografskih regijah ter so izjemno fenotipsko in genotipsko heterogeni. Imajo pomembno vlogo pri kroženju snovi v naravi, v bioremediaciji in biotehnologiji. Številne vrste imajo nenavadno visok hidrolitičen potencial in producirajo raznovrstne ekstracelularne encime –

DNaze, RNaze, proteaze, lipaze, elastaze in kot že omenjeno hitinaze. *S. maltophilia* pa je tudi pomemben oportunističen patogen (Berg in sod., 2005).

O hemolitični naravi te izredno zanimive bakterije ne vemo kaj dosti; hemolizo so opazili tako pri kliničnih kot tudi okoljskih izolatih, vendar se mnenja avtorjev o tipu hemolize razlikujejo – medtem ko Denton in Kerr (1998) navajata  $\alpha$ -hemolizo, večina drugih navaja  $\beta$ -hemolizo, ki se pojavi šele po 96 urah (Chhibber in sod., 2008; Garcia in sod., 2002). Sekvenca genomov sevov *S. maltophilia* R551-3 in K279a je razkrila prisotnost zapisa za hemolizin, soroden hemolizinu III iz vrste *Bacillus cereus*. Hemolizin III je trikomponentni bakterijski toksin, pri katerem sta vezava na celično membrano in tvorba por temperaturno odvisni, kasnejša liza eritrocitov pa je neodvisna od temperature (Baida in Kuzmin, 1996). Ker hemolizin predstavnikov rodu *Stenotrophomonas* še nikoli ni bil molekulsko kloniran in genetsko opredeljen, smo se odločili boljše spoznati genetsko ozadje citolizina izolata *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1. Vendar pa kloniranje in analiza nukleotidnega zaporedja DNA vključka kromosomske DNA hemolitičnega seva *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 ni prinesla pričakovanih in predvsem jasnih rezultatov. Med homologi produktov *orf*-ov v bazi podatkov nismo odkrili hemolizina ali citolitičnih proteinov oz. komponent. Poleg porinov imajo namreč citolitične lastnosti tudi fosfolipaze in proteini z detergentskim delovanjem (Alouf, 2002).

Sukloniranje je pokazalo, da hemolitično aktivnost kodirata (kodirajo) *orfF2* in *orfC1* ali (in) *orfB2*. Homologi v proteinski bazi so bili protein z domeno TAP (esteraza/lipaza) in lipoprotein seva *S. maltophilia* R551-3 oz. zunanji membranski lipoprotein seva *Stenotrophomonas* SKA14. O hemolitični lastnostih le-teh je v literaturi malo podatkov – lipoprotein s hemolitično aktivnostjo so izolirali in opredelili Khowala in sod. (1993) iz glive *Termitomyces clypeatus*; gen za esterazo iz *Pasteurella multocida* pa v anaerobnih razmerah posreduje hemolizo celicam *E. coli* (Hunt in sod., 2000). Potrebno pa je poudariti, da je raba izraza hemolizin omejena, saj številni proteini poleg eritrocitov lizirajo druge evkariontske celice ali pa le druge celice in ne eritrocitov (Alouf 2002). Sev *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 pa za razliko od večine okoljskih izolatov ni imel niti celulolitične niti hitinolitične aktivnosti.



### 5.1.6 Občutljivost za protimikrobne snovi

Antibiotiki so kemijske spojine biološkega izvora, ki povzročajo smrt mikroorganizmov oz. zavirajo njihovo rast. Delujejo kot močan selekcijski pritisk na bakterijske populacije, ki so sposobne hitro razviti mehanizme za odpornost; ti vključujejo encime za razgradnjo učinkovin ali mutacije porinov, celičnih proteinov, ki onemogočajo vezavo antibiotikov in črpalk, ki antibiotike izčrpavajo. Naravne antibiotike označujemo s skupnim imenom protimikrobne učinkovine.

Vzorec občutljivosti za oz. odpornosti bakterijskih izolatov proti testiranim protimikrobnim učinkovinam je v skladu z opazovanji mnogih avtorjev (Bhadra in sod., 2008; Martin in sod., 1997; Rantala in sod., 2004; Thoma in sod., 2009; Trujillo in sod., 2004).

Vsi izolati so bili občutljivi za rifampin in večina za ciprofloxacim. Med najbolj občutljive seve lahko na podlagi rezultatov uvrstimo izolat *Enhydrobacter* sp. ter tri predstavnike rodu *Microbacterium*. Najbolj odporni izolati pa so bili predstavniki rodov *Stenotrophomonas* in *Ochrobactrum*. V ta rodova sodijo znani oportunistični patogeni ki so zmožni bivalentnih interakcij tako z rastlinami kot tudi človeškim gostiteljem; mehanizmi, ki na eni strani omogočajo kolonizacijo rizosfere in posredujejo antagonizem proti rastlinskim patogenom, so namreč zelo podobni tistim, ki omogočajo kolonizacijo človeških tkiv in organov ter patogenost. Multipla odpornost proti antibiotikom pa ni omejena le na klinične izolate; pogosto je povezana tudi z okoljskimi sevi, še posebej izolati iz rizosfere. Kompeticija, prisotnost številnih različnih antibiotikov in horizontalni genski prenos v omenjenem mikrokolju pomembno prispevajo k naravni odpornosti (Berg in sod., 2005). Prisotnost multirezistentnih sevov v okoljih, kot so prebavilo kopenskega raka enakonožca ali voda Antarktike (De Souza in sod.) pa zastavlja nova vprašanja o izvoru in pomenu takšnih fenotipov.

## 5.2 SKLEPI

V sklopu naše naloge sicer nismo uspeli izolirati paličastih baciloplazem, ki se pritrdijo na kutikularne izraste papilarnega dela črevesa, smo pa zato izolirali in delno opisali nekatere druge zanimive in najverjetneje indigene ali avtohtone predstavnike prebavne mikrobiote navadnega prašička:

- devetnajst sevov, ki smo jih izolirali iz prebavila navadnega prašička, smo po primerjalni analizi nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNA uvrstili v 10 različnih bakterijskih rodov, ki sodijo v tri bakterijska debla. Nobeden od izolatov se ne uvršča v katero od opisanih mikrobnih skupin, ki so jih odkrili z molekularno biološkimi pristopi. Verjetno zato, ker predstavljajo t.i. redko biosfero, torej manjšinjske populacije, ki jih z običajnimi molekularnimi metodami ne zaznamo;
- pri nekaterih izolatih smo odkrili celulolitično aktivnost, pri enem pa tudi hitinolitično aktivnost. To kaže, da ti mikroorganizmi morda sodelujejo pri prehranskih procesih svojega gostitelja, ki se pretežno prehranjuje prav s strukturnimi polisaharidi, ali pa sodelujejo v procesih biokontrole glivnih patogenov;
- pri dveh izolatih smo odkrili dokaj močno hemolitično aktivnost in pri enem, t.j. pri sevu *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 molekularno genetsko opisali zapis, ki to aktivnost domnevno kodira. Primerjalna analiza nukleotidnih zaporedij odprtih bralnih okvirjev, ki to aktivnost domnevno posredujejo, je pokazala, da klonirani »geni« niso podobni doslej opisanim in poznanim hemolizinom;
- pri izoliranih sevih smo preučili tudi občutljivost za oz. odpornost proti nekaterim protimikrobnim snovem. Izolati iz rodov *Stenotrophomonas* in *Ochrobactrum* so bili odporni proti večini testiranih antibiotikov, izolati iz rodov *Enhydrobacter* in *Microbacterium* pa so bili nasprotno občutljivi za vse oz. večino antibiotikov. Vsi izolati so bili občutljivi za rifampin.

## 6 POVZETEK

Navadni prašiček *P. scaber* je razširjena vrsta kopenskih rakov enakonožcev. Čeprav se – podobno kot nekateri drugi členonožci prehranjuje s celulozo in z drugimi kompleksnimi polimeri bogatim rastlinskim materialom, je podatkov o mikroorganizmih, ki naseljujejo njegov prebavni trakt in bi mu pri razgradnji kompleksnih polisaharidov pomagali, zelo malo.

Čeprav nekateri raziskovalci menijo, da je prebavilo navadnega prašička zaradi svoje anatomske preprostosti, domnevno aerobnih razmer in pogostih levitev kutikule, ki prekriva steno črevesa, neprimerno okolje za razvoj avtohtone oz. indigene mikrobiote, so z elektronsko mikroskopijo opazili paličaste bakterije, ki se s konci pritrjajo na kutikularne izrastke črevesne stene v t.i. papilarni regiji v zadnjem delu črevesa. Z molekularnimi metodami so nato ugotovili, da omenjene bakterije predstavljajo doslej še nepoznano vejo mikoplazem in jo poimenovali '*Candidatus Bacilloplasma*'. V naši diplomski nalogi smo poskušali s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami izolacije na primernih gojiščih omenjene mikroorganizme osamiti in gojiti v laboratorijskih razmerah, kar bi omogočilo nadaljnja preučevanja teh zanimivih bakterij.

Na različnih agariziranih gojiščih, ki so v osnovi temeljila na poznanem gojišču za izolacijo mikoplazem, smo osamili večje število bakterijskih izolatov. Po preliminarnih fenotipskih preiskavah smo izbrali 19 morfološko različnih in zanimivih izolatov in jih identificirali z modernim molekularnim pristopom, t.j. s primerjalno analizo sekvenc genov, ki kodirajo ribosomsko molekulo v manjši ribosomski podenoti (16S rRNA). Izolate smo uvrstili v tri bakterijska debla (*Proteobacteria*, *Actinobacteria* in *Firmicutes*) in znotraj le teh v 10 različnih rodov – *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Enhydrobacter*, *Staphylococcus*, *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Janibacter*, *Microbacterium* in *Mycobacterium*. Preučevani izolati ne spadajo v mikrobne skupine, ki so bile doslej že opažene v prebavnem traktu navadnega prašička, bodisi z molekularnimi bodisi s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami. To ne preseneča, ker smo najverjetneje izolirali predstavnike t.i. redke biosfere, torej manjšinjskih populacij, ki jih z molekularnimi metodami običajno ne odkrijemo. Ker smo v naši nalogi izbrali dokaj specifična mikrobna gojišča, ki favorizirajo rast le nekaterih mikrobov, tudi to, da jih

doslej še niso odkrili v prebavnem traktu navadnega prašička s tradicionalnimi metodami, ne preseneča.

Izolate smo v nadaljevanju podrobneje fenotipsko opredelili. Polovica izolatov ni rasla pri temperaturi 37°C; izolati rodov *Brevibacterium* in *Microbacterium* pa so med inkubacijo na svetlobi tvorili živo oranžen oz. rumen pigment. Pri večini izolatov smo odkrili sposobnost razgradnje topne CMC-celuloze, hitinolitično aktivnost pa le pri izolatu *Stenotrophomonas* sp. P4-X3. Te bakterije torej morda s svojo hidrolitično aktivnostjo v resnici pomembno prispevajo k razgradnji kompleksnih biopolimerov v prebavilih navadnega prašička in s tem k prehrani gostitelja, morda pa sodelujejo tudi pri nadzoru oz. omejitvi patogenih mikroorganizmov, predvsem gliv.

Pri dveh izolatih, t.j. *Leucobacter* sp. P7a-A4 in *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 smo odkrili hemolitično aktivnost na krvnem agarju. V nadaljevanju dela smo zapis za hemolitično aktivnost seva *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1 klonirali ter ugotovili nukleotidno zaporedje približno 12 kbp dolgega fragmenta genomske DNA in to zaporedje analizirali z različnimi bioinformacijskimi orodji. Na podlagi analize nukleotidnega zaporedja klona pHEM smo ugotovili, da ne kodira hemolizina, ki bi bil po nukleotidnem zaporedju prepoznavno podoben kateremu od že opisanih hemolizinov. Zato smo fragment pHEM subklonirali in z aktivnostnimi testi ugotovili, da hemolitično aktivnost najverjetneje posredujeja dva oz. trije odprti bralni okvirji *orfF2* in *orfC1* oz. *orfB2*, ki so najbolj sorodni proteinu z domeno TAP in proteinu NLP/P60 seva *S. maltophilia* R551-3 oz. zunanjemembranskemu lipoproteinu seva *Stenotrophomonas* sp. SKA14.

V zadnjem delu naloge smo preverili še občutljivost oz. odpornost preučevanih izolatov na nekatere antibiotike. Vsi izolati so bili občutljivi za rifampin, izolati iz rodov *Stenotrophomonas* in *Ochrobactrum* pa so bili odporni proti večini testiranih antibiotikov. Izolati iz rodov *Enhydrobacter* in *Microbacterium* so bili nasprotno občutljivi za vse oz. večino antibiotikov. Razlike v odpornosti proti oz. občutljivosti za antibiotike smo opazili tudi med izolati, ki sodijo v iste rodove.

Čeprav je poskus izolacije avtohtonega predstavnika mikrobiote iz prebavnega trakta navadnega prašička spodletel, smo izolirali nekaj fenotipsko zanimivih predstavnikov črevesne mikrobiote. Njihovo preučevanje je razkrilo organizme z zanimivimi hidrolitičnimi sposobnostmi, kar kaže, da morda pomembno sodelujejo v prehranskih procesih gostitelja. Odkrili smo tudi organizme s potencialno patogenim fenotipom, in na genetskem nivoju opredelili zapis, ki kodira hemolitično aktivnost pri enem od izolatov.

## 7 VIRI

- Al Ahmadi K.J., Yazdi M.T., Najafi M.F., Shahverdi A.R., Faramarzi M.A., Zarrini G. in Behravan J. 2008. Optimization of Medium and Cultivation Conditions for Chitinase Production by the Newly Isolated: *Aeromonas* sp. *Biotechnology*, 7(2): 266-272
- Alouf J.E. 1999. Bacterial Protein Toxins. *Methods in Molecular Biology*. O. Holst Humana Press Inc, Totowa, NJ. 145
- Alouf J.E. 2003. Molecular Features of Cytolytic Pore-forming Bacterial Protein Toxins. *Folia Microbiol.*, 48(1): 5-16
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.*, 215, 3: 404-410
- Baida G.E., Kuzmin N.P. 1996. Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1284: 122-124
- Barry A.L., Fuchs P.C. 1991. In vitro activities of sparfloxacin, tosufloxacin, ciprofloxacin, and fleroxacin. *Antimicrob Agents Chemother. Clinical Microbiology Institute, Tualatin, Oregon*, 35(5): 955-960
- Beecher D.J., Wong A.C.L. 1997. Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *The Journal of Biological Chemistry. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.*, 272(1): 233-239.
- Berg G., Eberl L., Hartmann A. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7(11): 1673-1685
- Bhadra B., Raghukumar C., Pindi P.K., Shivaji S. 2008. *Brevibacterium oceani* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of the Chagos Trench, Indian Ocean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 57-60
- Cheng K.J., Costerton J.W. 1977. Ultrastructure of *Butyrivibrio fibrisolvens*: a Gram-Positive Bacterium? *Journal of Bacteriology*, 129, 3: 1506-1512
- Chhibber S., Gupta A., Sharan R., Gautam V., Ray P. 2008. Putative virulence characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia*: a study on clinical isolates. *World J Microbiol Biotechnol. Springer Verlag*, 24: 2819-2825
- Clarke P.H., Tracey M.V. 1956. The Occurrence of Chitinase in some Bacteria. *J. gen. Microbiol*, 14: 188-196

- Clegg C.D., van Elsas J.D., Anderson J.M., Lappin-Scott H.M. 1994. Assessment of the role of a terrestrial isopod in the survival of a genetically modified pseudomonad and its detection using the polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Ecol.*, 15: 161–168
- Cohen-Kupiec R., Chet I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology. Current Biology Ltd.*, 9: 270-277
- 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 Res.*, 37
- Connon S.A., Giovannoni S.J. 2002. High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 8: 3878-3885
- Crossman L.C., Gould V.C., Dow J.M., Vernikos G.S., Okazaki A., Sebahia M., Saunders D., Arrowsmith C., Carver T., Peters N., Adlem E., Kerhornou A., Lord A., Murphy L., Seeger K., Squares R., Rutter S., Quail M.A., Rajandream M., Harris D., Churcher C., Bentley S.D., Parkhill J., Thomson N R., Avison M.B. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biology. BioMed Central Ltd.*, 9: R7
- De Souza M.J., Nair S., Loka Bharathi P.A., Chandramohan D. 2006. Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology*, 15, 4: 379-384
- Del Sal G., Manfioletti G., Schneider C. 1988. A one-tube plasmid DNA mini-preparation suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.*, 16: 9878.
- Denton M., Kerr K.G. 1998. Microbiological and Clinical Aspects of Infection Associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology*, 11(1): 57-80
- Drobne D. 1997. Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ Toxicol Chem.*, 16: 1159–1164
- Drobne D., Rupnik M., Lapanje A., Štrus J., Janc M. 2002). Isopod gut flora parameters as endpoints in toxicity studies. *Environ Toxicol Chem.*, 21: 604–609
- Garcia D.O., Timenetsky J., Martinez M.B., Francisco W., Sinto S.I., Yanaguita R.M. 2002. Proteases (caseinase and elastase), hemolysins, adhesion and susceptibility to

- antimicrobials of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from clinical specimens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33: 157-162
- Gayathri R., Therese K.L., Deepa P., Mangai S., Madhavan H.N. 2010. Antibiotic susceptibility pattern of rapidly growing mycobacteria. *Journal of Postgraduate Medicine. Staff Society of the Seth GS Medical College and KEM Hospital, Mumbai, India*, 56(2): 76-78
- Gilbert H.J., Hazlewood G.P. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *Journal of General Microbiology*, 139: 187-194
- Gilbert R.J.C. 2002. Review: Pore-forming toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences. Birkhauser Verlag, Basel*, 59: 832-844
- Holmes B., Popoff M., Kiredjian M., Kersters K. 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from Human Clinical Specimens and Previously Known as Group Vd. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. International Union of Microbiological Societies*, 38(4): 406-416
- Hopkin S.P. 1991. *A Key to the Woodlice of Britain and Ireland*. AIDGAP (Aids to the Identification of Difficult Groups of Animals and Plants). Field Studies Council Publication
- Human Molecular Genetics.1999.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=hmg&part=A359> (avg. 2010)
- Hunt M.L., Cox A.J., Ruffolo C.G., Rajakumar K., Adler B. 2000. Characterisation of a *Pasteurella multocida* esterase gene which confers a hemolytic phenotype in *Escherichia coli* under anaerobic conditions. *Elsevier, FEMS Microbiology Letters*, 192, 249-256
- Ihnen K., Zimmer M. 2008. Selective consumption and digestion of little microbes by *Porcellio scaber* (Isopoda: Oniscidea). *Pedobiologia. Elsevier GmbH*, 51: 335-342.
- Kaerberlein T., Lewis K., Epstein S.S. 2002. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science*, 296, 1127-1129
- Khowala S., Banerjee P.C., Ghosh A.K., Sengupta S. 1993. A hemolytic protein from cultured mycelia of mushroom, *Termitomyces clypeatus*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 31, 45-49
- Kobayashi D.Y., Reedy R.M., Bick J.A., Oudemans P.V. 2002. Characterization of a Chitinase Gene from *Stenotrophomonas maltophilia* Strain 34S1 and Its Involvement in Biological Control. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3: 1047-1054



- Kono M., Matsui T., Shimizu C. 1987. Effect of Chitin, Chitosan, and Cellulose as Diet Supplements on the Growth of Cultured Fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1: 125-129
- Kostanjšek R., 2002. Indigena bakterijska flora v prebavilu kopenskega raka enakonožca *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Doktorska dizertacija: 121 str.
- Kostanjšek R., Štrus J., Avguštin G. 2002a. Genetic diversity of bacteria associated with the hindgut of the terrestrial crustacean *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *FEMS Microbiology Ecology*, 40: 171–179
- Kostanjšek R., Štrus J., Avguštin G. 2000. Genetska raznolikost bakterij v črevesu enakonožnih rakov (Isopoda, Crustacea). *Zb. Biotehniške fak. Univ. v Ljubljani. Kmetijstvo. Zootehnika*, 76(2000)1
- Kostanjšek R., Štrus J., Lapanje A., Avguštin G., Rupnik M., Drobne D. 2006. Intestinal Microbiota of Terrestrial Isopods. *Soil Biology*, 6, 115-130
- Kostanjšek R., Milatovič M., Štrus J. 2010. Endogenous origin of endo- $\beta$ -1,4-glucanase in common woodlouse *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda). *J Comp Physiol B. Springer Verlag*
- Kostanjšek R., Avguštin G., Drobne D., Štrus J. 2003. Morphological and molecular examination of bacteria associated with the wall of the papillate region of the gut in *Porcellio scaber*. Sfenhourakis S et al (eds) *Crust Monogr.*, 2: 103–120, Koninklijke Brill N V, Leiden
- Kostanjšek R., Lapanje A., Rupnik M., Štrus J., Drobne D., Avguštin G. 2004a. Anaerobic bacteria in the gut of terrestrial isopod crustacean *Porcellio scaber*. *Folia Microbiol.*, 49(2): 179–182
- Kostanjšek R., Štrus J., Drobne D., Avguštin G. 2004b. '*Candidatus* Rhabdochlamydia porcellionis' an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). *Int J Syst Evol Microbiol.*, 54: 543–549
- Kostanjšek R., Štrus J., Avguštin G. 2007. '*Candidatus* Bacilloplasma', a novel lineage of Mollicutes associated with the hindgut wall of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: isopoda). *Appl. environ. Microbiol.*, 73, 17: 5566-5573
- Koyama Y. 1991. Color of Actinomycetes. *Actinomycetologica*, 5, 2: 78-85
- Liu H., Xu Y., Ma Y., Zhou P. 2000. Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Great Britain, 50: 715-719

- Lucet J.C., Herrmann M., Rohner P., Auckenthaler R., Waldvogel F.A., Lew D.P. 1990. Treatment of experimental foreign body infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. Department of Medicine, Geneva University Hospital, Switzerland, 34(12): 2312-2317.
- Margulis L., Jorgensen J.Z., Dolan S., Kolchinsky R., Rainey F.A. 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. Proc Natl Acad Sci, USA, 95: 1236–1241
- Martin K., Schumann P., Rainey F.A., Schuetze B., Groth I. 1997. *Janibacter limosus* gen. nov., sp. nov., a New Actinomycete with *meso*-Diaminopimelic Acid in the Cell Wall. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. International Union of Microbiological Societies, 47: 529-534
- Minkwitz A., Berg G. 2000. Comparison of Antifungal Activities and 16S Ribosomal DNA Sequences of Clinical and Environmental Isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, 2001, 139-145
- Mukry S.N., Ahmad A., Khan S.A. 2010. Screening and partial characterization of hemolysins from *Bacillus* sp.: strain S128 and S144 are hemolysins B (HBL) producers. Pak. J. Bot, 42(1): 463-472.
- Pedros-Alio C. 2006. Marine microbial diversity: can it be determined?. Elsevier Ltd., Trends in Microbiology, 14, 6: 257-263
- Paoletti M.G., Hassall M. 1999. Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. Agriculture Ecosystems & Environment, 74: 157-165
- Popavath R.N., Gurusamy R., Kannan B.N., Natarajan S. 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent *Pseudomonads* isolated from rhizospheric soil. BMC Microbiology, 8: 230
- Ramel G. 2010. The Woodlice (Crustacea, Isopoda, Oniscidea). <http://www.earthlife.net/insects/isopoda.html> (okt. 2010)
- Rantala M., Lahti E., Kuhalampi J., Pesonen S., Järvinen A.K., Saijonmaa-Koulumies L., Honkanen-Buzalski T. 2004. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in dogs given antibiotics for chronic

- dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. *Acta vet. Scand.*, 45: 37-45.
- Roberts W.K., Selitrennikoff C.P. 1988. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *Journal of General Microbiology*, 134: 169-176
- Romanenko L.A., Uchino M., Tanaka N., Frolova G.M., Slinkina N.N. in Mikhailov V.V. 2007. Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch Microbiol* (2008). Springer-Verlag, 189: 337-344.
- Ryan R.P., Monchy S., Cardinale M., Taghavi S., Crossman L., Avison M.B., Berg G., van der Lelie D. In Dow J.M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews, Microbiology*. Macmillan Publishers Limited, 7: 514-525
- Sket B., Gogala m., Kuštor V. 2003. *Živalstvo Slovenije*. 1.izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 664 str.
- Smith R.F., Wiese B.A., Wojzynski M.K., Davison D.B., Worley K.C. 1996. BCM Search Launcher - An Integrated Interface to Molecular Biology Data Base Search and Analysis Services Available on the World Wide Web. *Genome Res.*, 6(5): 454-62
- Somvanshi V.S., Lang E., Schumann P., Pukall R., R. M. Kroppenstedt R.M., Ganguly S., Stackebrandt E. 2007. *Leucobacter iarius* sp. nov., in the family *Microbacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. International Union of Microbiological Societies, 57: 682-686
- Staley J.T., Irgens R.L., Brenner D.J. 1987. *Enhydrobacter aerasaccus* gen. nov., sp. nov. a Gas-Vacuolated, Facultatively Anaerobic, Heterotrophic Rod. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. International Union of Microbiological Societies, 37(3): 289-291
- Steven B., Briggs G., McKay C.P., Pollard W.H., Greer W.C., Whyte L.G. 2007. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 59, 513-523
- Sukumaran R.K., Singhanian R.R., Pandey A. 2005. Microbial cellulases – Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64: 832-844

- Swiecicka I., Mahillon J. 2006. Diversity of commensal *Bacillus cereus sensu lato* isolated from the common sow bug (*Porcellio scaber*, Isopoda). FEMS Microbiol Ecol. Blackwell Publishing Ltd., 56: 132-140
- Szlávecz K., Maiorana V.C. 1998. Supplementary food in the diet of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latr (Isopoda: Oniscidea). Israel J Zool, 44: 413–422
- Teather R. M., Wood P. J. 1981. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. Applied and Environmental Microbiology, 43, 4: 777-780
- Thoma B., Straube E., Scholz H.C., Al Dahouk S., Zöller L., Pfeffer M., Neubauer H., Tomaso H. 2009. Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. International Journal of Medical Microbiology, 299(3): 209-220
- Trinkerl M., Breunig A., Schauder R., König H. 1990. *Desulfovibrio termitidis* sp. nov., a Carbohydrate-degrading sulfate-reducing bacterium from the hindgut of a termite. Systematic applied microbiology, 13: 372–377
- Trujillo M.E., Velázquez E., Kroppenstedt R.M., Schumann P., Rivas R., Mateos P.F., Martínez-Molina E. 2004. *Mycobacterium psychrotolerans* sp. nov., isolated from pond water near a uranium mine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1459–1463
- Tsukamura M. 1981. Relationship Between Photochromogenicity and Test Temperature in *Mycobacteria*. Journal of Clinical Microbiology, 14, 2: 225-226
- Ullrich B., Storch V., Schairer H. 1991. Bacteria in the food, in the intestine and in the faeces of the woodlouse *Oniscus asellus* (Crustacea, Isopoda). Pedobiologia, 35: 41–51
- Vincze T., Posfai J., Roberts R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzyme. Nucl. Acids Res., 31, 13: 3688-3691
- Wallace R.J. jr., Bedsole G., Sumter G., Sanders C.V., Steele L.C., Brown B.A., Smith J., Graham D.R. 1990. Activities of Ciprofloxacin and Ofloxacin against Rapidly growing *Mycobacteria* with Demonstration of Acquired Resistance following Single-Drug Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, 34(1) 65-70
- Wang Q., Garrity G.M, Tiedje J.M, Cole J.R. 2007. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. Appl Environ Microbiol., 73(16): 5261-5267

- Warburg M.R. 1987. Isopods and their terrestrial environment. *Advances in Ecological Research*. Academic Press Inc, London, 17: 187–242
- Wauters G., Haase G., Avesani V., Charlier J., Janssens M., Van Broeck J., Delmée M. 2004. Identification of a Novel *Brevibacterium* Species Isolated from Humans and Description of *Brevibacterium sanguinis* sp. nov. *Clin Microbiol. American Society for Microbiology*, 42(6): 2829–2832
- Welch A.B., Maxcy R.B. 1979. Significance of Hemolytic Activity of Some Radiation-Resistant Micrococci in Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 38(5): 902-905
- Wieser W. 1966. Cooper and the role of isopods in degradation of organic matter. *Science*, 153: 67–69
- Wolf A., Fritze A., Hagemann M., Berg G. 2002. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. International Union of Microbiological Societies, 52: 1937-1944
- Wood S, Griffiths B.S. 1988. Bacteria associated with the hepatopancreas of the woodlice *Oniscus asellus* (Crustacea, Isopoda). *Pedobiol.*, 31: 89–94
- Zengler K., Toledo G., Rappe M., Elkins J., Mathur E.J., Short J.M., Keller M. 2002. Cultivating the uncultured. *California Institute of Technology, Pasadena, CA, PNAS*, 99, 24: 15681-15686
- Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24: 452-481
- Zimmer M., Kautz G., Topp W. 2003. Leaf litter-colonizing microbiota: supplementary food source or indicator of food quality for *Porcellio scaber* (Isopoda: Oniscidea) *European Journal of Soil Biology*. Elsevier SAS, 39: 209-216
- Zimmer M., Brune A. 2005. Physiological properties of the gut lumen of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): adaptive to digesting lignocellulose?. *J Comp Physiol B.*, 175: 275-283
- Zimmer M., Topp W. 1997. Does leaf litter quality influence population parameters of the common woodlouse, *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda)? *Biol Fertil Soils*, 24: 435–441
- Zimmer M., Topp W. 1998a. Nutritional biology of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): cooper revisited. *Israel J Zool*, 44: 453–462

Zimmer M., Topp W. 1998b. Microorganisms and cellulose digestion in the gut of the woodlouse *Porcellio scaber*. *J Chem Ecol.*, 24: 1397–1408

Zimmer M., Danko J.P., Pennings S.C., Danford A.R., Ziegler A., Uglow R.F., Carefoot T.H. 2001. Hepatopancreatic endosymbionts in coastal Isopods (Crustacea: Isopoda), and their contribution to digestion. *Marine Biol.*, 138: 955–963

## **ZAHVALA**

V prvi vrsti se najlepše zahvaljujem mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za vodenje ter neizmerno razumevanje, potrpežljivost, prilagodljivost in vse dobrohotne nasvete. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Miklavžu Grabnarju ter doc. dr. Roku Kostanjšku za izredno hiter pregled diplomskega dela.

Še enkrat hvala doc. dr. Roku Kostanjšku za poskusne živali, pripravo vzorcev in mikroskopijo.

Hvala tehničnim sodelavcem ga. Fani Oven, g. Gregorju Bajcu in ga. Barbari Kastelic Bokal za vso malo pomoč, optimizem in prijaznost ter tudi vsem ostalim s Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, še posebno pa dr. Zdravku Podlesku, ki je nemalokrat delil svoje znanje in nasvete ter sem ter tja odstopil tudi svoj laboratorij.

In nenazadje tudi posebna zahvala prof. dr. Gorazdu Avguštinu za velik prispevek pri nastanku tega dela.

## PRILOGE

### Priloga A

Nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA bakterijskih izolatov iz zadnjega črevesa  
*P. scaber*

### Priloga A1

Nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA bakterijskih izolatov, ugotovljeno s parom  
začetnih oligonukleotidov fD1/1392r

#### *Ochrobactrum* sp. P3-V1

```
1 GCTTAAACAT GCAAGTCGAG CGCCCCGCAA GGGGAGCGGC AGACGGGTGA
51 GTAACGCGTG GGAACGTACC TTTTGTACG GAATAACTCA GGGAAACTTG
101 TGCTAATACC GTATGTGCC TTCGGGGGAA AGATTTATCG GCAAAGGATC
151 GGCCCGCGTT GGATTAGCTA GTTGGTGAGG TAAAGGCTCA CCAAGGCGAC
201 GATCCATAGC TGGTCTGAGA GGATGATCAG CCACACTGGG ACTGAGACAC
251 GGCCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGCG
301 CAAGCCTGAT CCAGCCATGC CGCGTGAGTG ATGAAGGCC TAGGGTTGTA
351 AAGCTCTTTC ACCGGTGAAG ATAATGACGG TAACCGGAGA AGAAGCCCCG
401 GCTAACTTCG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGAAGGGGGC TAGCGTTGTT
451 CGGATTTACT GGGCGTAAAG CGCACGTAGG CGGACTTTTA AGTCAGGGGT
501 GAAATCCCGG GGCTCAACCC CGGAACTGCC TTTGATACTG GAAGTCTTGA
551 GTATGGTAGA GGTGAGTGA ATTCCGAGTG TAGAGGTGAA ATTCGTAGAT
601 ATTCCGAGGA ACACCAGTGG CGAAGGCGGC TCACTGGACC ATTACTGACG
651 CTGAGGTGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC
701 CACGCCGTAA ACGATGAATG TTAGCCGTTG GGGAGTTTAC TCTTCGGTGG
751 CGCAGCTAAC GCATTAAACA TTCCGCCTGG GGAGTACGGT CGCAAGATTA
801 AAAC TCAAAG GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT
851 TAATTCGAAG CAACGCGCAG AACCTTACCA GCCCTTGACA TACCGGTCCG
901 GGACACAGAG ATGTGTCTTT CAGTTCGGCT GGACCGGATA CAGGTGCTGC
951 ATGGCTGTG TCAGCTCGTG TCGTGAGATG TTGGGTAAAG TCCC GCAACG
1001 AGCGCAACCC TCGCCCTTAG TTGCCAGCAT TTAGTTGGGC ACTCTAAGG
1051 GACTGCCGTT GATAAGCCGA GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCC TCA
1101 TGGCCCTTAC GGGCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTG GTGACAGTGG
1151 GCAGCGAGCA CGCGAGTGTG AGCTAATCTC CAAAAGCCAT CTCAGTTCGG
1201 ATTGCACTCT GCAACTCGAG TGCATGAAGT TGGAAATCGCT AGTAWCGCGG
1251 ATCAGCATG
```

#### *Stenotrophomonas* sp. P7a-A1

```
1 AACACATGCA AGTCGAACGG CAGCACAGTA GAGCTTGCTC TATGGGTGGC
51 GAGTGGCGGA CGGGTGAGGA ATACATCGGA ATCTACCTTT TCGTGGGGGA
101 TAACGTAGGG AAAC TTACGC TAATACCGCA TACGACCTTC GGGTGAAAGC
151 AGGGGACCTT CGGGCTTGC GCGGATAGAT GAGCCGATGT CGGATTAGCT
201 AGTTGGCGGG GTAAAGGCC ACCAAGGCGA CGATCCGTAG CTGGTCTGAG
251 AGGATGATCA GCCACACTGG AACTGAGACA CGGTCCAGAC TCCTACGGGA
301 GGCAGCAGTG GGGAAATATT GACAATGGGC GCAAGCCTGA TCCAGCCATA
351 CCGCGTGGGT GAAGAAGGCC TTCGGGTGTG AAAGCCCTTT TGTTGGGAAA
401 GAAAAGCAGT CGGCTAATAC CCGGTTGTTC TGACGGTACC CAAAGAATAA
451 GCACCGGCTA ACTTCGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGAA GGGTGCAAGC
501 GTTACTCGGA ATTACTGGGC GTAAAGCGTG CGTAGGTGGT TGTTTAAAGTC
551 TGTTGTGAAA GCCCTGGGCT CAACCTGGGA ATTGCAGTGG ATACTGGGCG
601 ACTAGAGTGT GGTAGAGGGT AGTGGAATTC CCGGTGTAGC AGTGAAATGC
```



```

651 GTAGAGATCG GGAGGAACAT CCATGGCGAA GGCAGCTACC TGGACCAACA
701 CTGACACTGA GGCACGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG
751 GTAGTCCACG CCCTAAACGA TGCGAACTGG ATGTTGGGTG CAATTTGGCA
801 CGCAGTATCG AAGCTAACGC GTTAAGTTCG CCGCCTGGGG AGTACGGTCCG
851 CAAGACTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCCGCACAA GCGGTGGAGT
901 ATGTGGTTTA ATTCGATGCA ACGCGAAGAA CCTTACCTGG TCTTGACATG
951 TCGAGAACTT TCCAGAGATG GATTGGTGCC TTCGGGAAct CGAACACAGG
1001 TGCTGCATGG CTGTCTCAG CTCGTGTCGT GAGATGTTGG GTTAAGTCCC
1051 GCAACGAGCG CAACCCCTGT CCTTAGTTGC CAGCACGTAA TGGTGGGAAC
1101 TCTAAGGAGA CCGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA
1151 GTCATCATGG CCCTTACGAC CAGGGCTACA CACGTACTAC AATGGTAGGG
1201 ACAGAGGGCT GCAAACCCGC GAGGGCAAGC CAATCCCAGA AACCCATCT
1251 CAGTCCGGAT TGGAGTCTGC AACTCGACTC CATGAAGTCG GAATCGCTAG
1301 TAATCGCAGA TCAGCA
    
```

### *Enhydrobacter* sp. P6a-Z1

```

1 CTTAACACAT GCAAGTCGAA CGATGATTAT CTAGCTTGCT AGATATGATT
51 AGTGGCGGAC GGGTGAGTAA CATTTAGGAA TCTGCCTAGT AGTGGGGGAT
101 AGCTCGGGGA AACTCGAATT AATACCGCAT ACGACCTACG GGTGAAAGGG
151 GCGCAAGCT CTTGCTATTA GATGAGCCTA AATCAGATTA GCTAGTTGGT
201 GGGGTAAAGG CCCACCAAGG CGACGATCTG TAACTGGTCT GAGAGGATGA
251 TCAGTCACAC CGGAACTGAG ACACGGTCCG GACTCCTACG GGAGGCAGCA
301 GTGGGGAATA TTGGACAATG GGGGCAACCC TGATCCAGCC ATGCCGCGTG
351 TGTGAAGAAG GCCTTTTGGT TGTAAGCAC TTTAAGCAGG GAGGAGAGGC
401 TAATGGTTAA TACCCATTAG ATTAGACGTT ACCTGCAGAA TAAGCACCGG
451 CTAACTCTGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC AGAGGGTGCAGCC AGCGTTAATC
501 GGAATTACTG GGCGTAAAGC GAGTGTAGGT GGCTCATTA GTACATGTG
551 AAATCCCGG GCTTACCTG GGAACGTCAT GTGATACTGG TGGTGTAGA
601 ATATGTGAGA GGGAAAGTGA ATTCCAGGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG
651 ATCTGGAGGA ATACCGATGG CGAAGGCAGC TTCTTGGCAT AATATTGACA
701 CTGAGATTCG AAAGCGTGGG TAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC
751 CACGCCGTAA ACGATGTCTA CTAGCCGTTG GGGTCCTTGA GACTTTAGTG
801 GCGCAGTTAA CGCGATAAGT AGACCGCCTG GGGAGTACGG CCGCAAGGTT
851 AAAACTCAA TGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT
901 TTAATTCGAT GCAACGCGAA GAACCTTACC TGGTCTTGAC ATAGTGAGAA
951 TCCTGCAGAG ATGCGGGAGT GCCTTCGGGA ATTACATAC AGGTGCTGCA
1001 TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT TGGGTAAAGT CCCGCAACGA
1051 GCGCAACCCCT TTTCTTATT TGCCAGCGGG TTAAGCCGGG AACTTTAAGG
1101 ATACTGCCAG TGACAAACTG GAGGAAGGCG GGGACGACGT CAAGTCATCA
1151 TGGCCCTTAC GACCAGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTA GGTACAGAGG
1201 GTTGCTACAC AGCGATGTGA TGCTAATCTC AAAAAGCCTA TCGTAGTCCG
1251 GATTGGAGTC TGCAACTCGA CTCCATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC
1301 AGATCAGAAT G
    
```

### *Staphylococcus* sp. P7a-A16

```

1 GCCTAATACA TGCAAGTCGA GCGAACAGAC GAGGAGCTTG CTCCTTTGAC
51 GTTAGCGGCG GACGGGTGAG TAACACGTAG GTAACCTACC TATAAGACTG
101 GGATAACTTC GGGAAACCGG AGCTAATACC GGATAATATT TCGAACCGCA
151 TGGTTCGATA GTGAAAGATG GCTTTGCTAT CACTTATAGA TGGACCTGCG
201 CCGTATTAGC TAGTTGGTAA GGTAACGGCT TACCAAGGCA ACGATACGTA
251 GCCGACCTGA GAGGGTGATC GGCCACACTG GAACTGAGAC ACGGTCCAGA
301 CTCTACGGG AGGCAGCAGT AGGGAATCTT CCGCAATGGG CGAAAGCCTG
351 ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT CTTCCGATCG TAAACTCTG
    
```

```

401 TTATTAGGGA AGAACAAACG TGTAAGTAAC TGTGCACGTC TTGACGGTAC
451 CTAATCAGAA AGCCACGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT
501 AGGTGGCAAG CGTTATCCGG AATTATTGGG CGTAAAGCGC GCGTAGGCGG
551 TTTTTTAAGT CTGATGTGAA AGCCCACGGC TCAACCGTGG AGGGTCATTG
601 GAAACTGGAA AACTTGAGTG CAGAAGAGGA AAGTGGAAAT CCATGTGTAG
651 CGGTGAAATG CGCAGAGATA TGGAGGAACA CCAGTGGCGA AGGCGACTTT
701 CTGGTCTGTA ACTGACGCTG ATGTGCGAAA GCGTGGGGAT CAAACAGGAT
751 TAGATACCCCT GGTAGTCCAC GCCGTAAACG ATGAGTGCTA AGTGTTAGGG
801 GGTTTCCGCC CCTTAGTGCT GCAGCTAACG CATTAAGCAC TCCGCCTGGG
851 GAGTACGACC GCAAGGTTGA AACTCAAAGG AATTGACGGG GACCCGCACA
901 AGCGGTGGAG CATGTGGTTT AATTCGAAGC AACGCGAAGA ACCTTACCAA
951 ATCTTGACAT CCTTTGACCC TTCTAGAGAT AGAAGTTTCC CCTTCGGGGG
1001 ACAAAGTGAC AGGTGGTGCA TGGTTGTCTG CAGCTCGTGT CGTGAGATGT
1051 TGGGTAAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCT TAAGCTTAGT TGCCATCATT
1101 AAGTTGGGCA CTCTAAGTTG ACTGCCGGTG ACAAACCGGA GGAAGTGGG
1151 GATGAGTCA AATCATCATG CCCCTTATGA TTTGGGCTAC ACACGTGCTA
1201 CAATGGACAA TACAAAGGGC AGCGAAACCG CGAGGTCAAG CAAATCCCAT
1251 AAAGTTGTTC TCAGTTCGGA TTGTAGTCTG CAACTCGACT ACATGAAGCT
1301 GGAATCGCTA GTAATCGTAG
    
```

### *Staphylococcus* sp. P3-E2

```

1 GCGTGCCTAA TACATGCAAG TCGAGCGAAC AGATAAGGAG CTTGCTCCTT
51 TGACGTTAGC GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGTAACC TACCTATAAG
101 ACTGGGATAA CTTCGGGAAA CCGGAGCTAA TACCGGATAA CATTTGGAAC
151 CGCATGGTTC TAAAGTGAAA GATGGTTTTG CTATCACTTA TAGATGGACC
201 CGCGCCGTAT TAGCTAGTTG GTAAGGTAAC GGCTTACCAA GGCGACGATA
251 CGTAGCCGAC CTGAGAGGGT GATCGGCCAC ACTGGAAC TG AGACACGGTC
301 CAGACTCCTA CGGGAGGACAG CAGTAGGGAA TCTTCCGCAA TGGGCGAAAG
351 CCTGACGGAG CAACGCCGCG TGAGTGATGA AGGGTTTCGG CTCGTA AAAAC
401 TCTGTTATTA GGGAAAGAACA AAYGTGTAAG TAACTGTGCA CGTCTTGACG
451 GTACCTAATC AGAAAAGCCAC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT
501 ACGTAGGTGG CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGCGCGTAG
551 GCGGTTTCTT AAGTCTGATG TGAAAGCCCA CGGCTCAACC GTGGAGGGTC
601 ATTGAAACT GGGAAACTTG AGTGCAGAAG AGGAAAGTGG AATTCCATGT
651 GTAGCGGTGA AATGCGCAGA GATATGGAGG AACACCAGTG GCGAAGCGGA
701 CTTTCTGGTC TGTAAGTACG GCTGATGTGC GAAAGCGTGG GGATCAAACA
751 GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCACGCCGTA AACGATGAGT GCTAAGTGTT
801 AGGGGGTTTC CGCCCCTTAG TGCTGCAGCT AACGCATTAA GCACTCCGCC
851 TGGGGAGTAC GACCGCAAGG TTGAAACTCA AAGGAATTGA CGGGGACCCG
901 CACAAGCGGT GGAGCATGTG GTTTAATTTC AAGCAACGCG AAGAACCTTA
951 CCAAATCTTG ACATCCTTTG AAAACTCTAG AGATAGAGCC TTCCCCTTCG
1001 GGGGACAAAAG TGACAGGTGG TGCATGGTTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG
1051 ATGTTGGGTT AAGTCCCAGCA ACGAGCGCAA CCCTTAAGCT TAGTTGCCAT
1101 CATTAAAGTTG GGCACTCTAG GTTGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG
1151 TGGGGATGAC GTCAAATCAT CATGCCCTT ATGATTTGGG CTACACACGT
1201 GCTACAATGG ACAATACAAA GGGCAGCTAA ACCGCGAGGT CATGCAAATC
1251 CCATAAAGTT GTTCTCAGTT CGGATTGTAG TCTGCAACTC GACTACATGA
1301 AGCTGGAATC GCTAGTAATC GTAGATCAGC AT
    
```

### *Leucobacter* sp. P7a-A4

```

1 TTAAACATGC AAGTCGAACG CTGAAGCCCA GTGCTTGCAC TGGGTGGATG
51 AGTGCGGAAC GGGTGAGTAA CACGTGAGTA ACCTGCCCCG GACTCTGGGA
101 TAAGCGCTGG AAACGGTGTC TAATACTGGA TAGGTGACGT GGCCGCATGG
151 TCTGCGTTTG GAAAGTTTTT TCGGTTCCGG ATGGGCTCGC GGCCATACAG
    
```

```

201 CTGGATGGTG GGGTAATGGC TCACCATGGC GACGACGGGT AGCCGGCCTG
251 AGAGGGTGAC CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCCAG ACTCCTACGG
301 GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCAA
351 CGCCGCGTGA GGGATGACGG CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTTAGTCAGG
401 AAGAAGCCTT TCGGGGTGAC GGTACTGGCA GAAAAAGCAC CGGCTAACTA
451 CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGT GCAAGCGTTG TCCGGAATTA
501 TTGGGCGTAA AGAGCTCGTA GGCGGCTTGT CGCGTCTGCC GTGAAATCCT
551 CAGGCTCAAC CTGGGGCTTG CGGTGGGTAC GGGCAGGCTA GAGTGCGGTA
601 GGGGAGATTG GAATTCCTGG TGTAGCGGTG GAATGCGCAG ATATCAGGAG
651 GAACACCGAT GGCGAAGGCA GATCTCTGGG CCGCTACTGA CGCTGAGGAG
701 CGAAAAGCATG GGGAGCGAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCATGCCGT
751 AAACGTTGGG AACTAGATGT AGGGCCTGTT CCACGGGTTT TGTGTCTGTG
801 CTAACGCATT AAGTTCCTCCG CCTGGGGAGT ACGGCCGCAA GGCTAAAAC
851 CAAAGGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG GCGGAGCATG CGGATTAATT
901 CGATGCAACG CGAAGAACCT TACCAAGGCT TGACATATAG GAGAACGGGC
951 CAGAAATGGT CAACTCTTTG GACACTTCTA TACAGGTGGT TACATGGTTGT
1001 CGTCAGCTCG TGTCTGAGTA GTTTCGGTTA AGTCCGGCAA CGAGCGCAAC
1051 CCTCGTCCCTA TGTTGCCAGC ACGTGATGGT GGGAACTCAT GGGATACTGC
1101 CGTGGTCAAC ACGGAGGAAG GTGGGGACGA CGTCAAATCA TCATGCCCTT
1151 TATGTCTTGG GCTTCACGCA TGCTACAATG GCCGGTACAA TGGGCTGCGA
1201 TGCCGTAAGG TGGAGCGAAT CCCAAAAAGC CGGTCTCAGT TCGGATTGGG
1251 GTCTGCAACT CGACCCCATG AAGTCGGAGT CGCTAGTAAT CGCAG
    
```

### *Janibacter* sp. P2-W2

```

1 ATGCAAGTCG AACGGTGAAG CTCCAGCTTG CTGGAGTGGG TCAGTGGCGA
51 ACGGGTGAGT AACACGTGAG CAACCTGCCC CAAACTCTGG AATAAGCGCT
101 GGAAACGGCG TCTAATACTG GATACGAGAC CAACCTGCAT GGGTATGGTT
151 TGGAAAGTTT TTCGGTTTGG GATGGGCTCG CGGCCTATCA GCTTGTGGT
201 GAGGTAATGG CTCACCAAGG CGACGACGGG TAGCCGGCCT GAGAGGGCGA
251 CCGGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA
301 GTGGGGAATA TTGCACAATG GCGCAAAGCC TGATGCAGCG ACGCCGCGTG
351 AGGGATGACG GCCTTCGGGT TGTAACCTC TTTTCAGCAGG GAAGAAGCGA
401 AAGTGACGGT ACCTGCAGAA GAAGCACCGG CTAACCTACG GCCAGCAGCC
451 GCGGTAATAC GTAGGGTGCG AGCGTTGTCC GGAATTATTG GGCGTAAAGA
501 GCTTGTAGGC GGTTTGTGCG GTCTGCTGTG AAAATCCGGG GCTCAACCCC
551 GGAATTGCAG TGGGTACGGG CAGACTAGAG TGTGGTAGGG GAGACTGGAA
601 TTCTGGTGT AGCGGTGAAA TGCGCAGATA TCAGGAGGAA CACCGATGGC
651 GAAGGCAGGT CTCTGGGCCA CACTGACGC TGAGAAGCGA AAGCATGGGG
701 AGCGAACAGG ATTAGATACC CTGGTAGTCC ATGCCGTAAC CGTTGGGAAC
751 TAGGTGTGGG TCTCATTCCA CGAGATCCGT GCCGCAGCTA ACGCATTAAG
801 TTCCCCGCCT GGGGAGTACG GCCGCAAGGC TAAACTCAA AGGAATTGAC
851 GGGGGCCCGC ACAAGCGGCG GAGCATGCGG ATTAATTCGA TGCAACGCGA
901 AGAACCTTAC CAAGGCTTGA CATATACCGG AAACCTCCAG AGATGGTTGC
951 CCCTTTTAGG TCGGTATACA GGTGGTGCAT GGTGTGTCGTC AGCTCGTGTG
1001 GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCCT GTTCTATGTT
1051 GCCAGCACGT AATGGTGGGG ACTCATGGAA GACTGCCGGG GTCAACTCGG
1101 AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAATCATCAT GCCCCTTATG TCTTGGGCTT
1151 CACGCATGCT ACAATGGCCG GTACAAAAGG CTGCGATACC GCAAGGTGGA
1201 GCGAATCCCA AAAAACCAGG CTCAGTTCGG ATTGGGGTCT GCAACTCGAC
1251 CCCATGAAGT CGGAGTCGCT AGTAATCGCA GATCAGCAAC
    
```

### *Microbacterium* sp. P6a-W1

```

1 TAAACATGCA AGTCGAACGA TGAACCAGGT GCTTGCACCT GGGGATTAGT
51 GGCGAACGGG TGAGTAACAC GTGAGCAACC TGCCCTGAC TCTGGGATAA
    
```

101	GCGCTGGAAA	CGGTGTCTAA	TACTGGATAC	GAACAAGAAT	CGCATGGTTA
151	CTTGTTGGAA	AGATTTTTTTG	GTTGGGGATG	GGCTCGCGGC	CTATCAGCTT
201	GTTGGTGAGG	TAATGGCTCA	CCAAGGCGTC	GACGGGTAGC	CGGCCTGAGA
251	GGGTGACCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GGCCCAGACT	CCTACGGGAG
301	GCAGCAGTGG	GGAATATTGC	ACAATGGGCG	GAAGCCTGAT	GCAGCAACGC
351	CGCGTGAGGG	ATGACGGCCT	TCGGGTTGTA	AACCTCTTTT	AGCAGGGAAG
401	AAGCGTGAGT	GACGGTACCT	GCAGAAAAAG	CGCCGGCTAA	CTACGTGCCA
451	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG	GGCGCAAGCG	TTATCCGGAA	TTATTGGGCG
501	TAAAGAGCTC	GTAGGCGGTT	TGTCGCGTCT	GCTGTGAAAT	CCCAGGGCTC
551	AACTTCGGGT	CTGCAGTGGG	TACGGGCAGA	CTAGAGTGCG	GTAGGGGAGA
601	TTGGAATTCC	TGGTGTAGCG	GTGGAATGCG	CAGATATCAG	GAGGAACACC
651	GATGGCGAAG	GCAGATCTCT	GGGCCGTAAC	TGACGCTGAG	GAGCGAAAGG
701	GTGGGGAGCA	AACAGGCTTA	GATACCCTGG	TAGTCCACCC	CGTAAACGTT
751	GGGAAGTAGT	TGTGGGGTCC	ATTCCACGGA	TTCCGTGACG	CAGCTAACGC
801	ATTAAGTTCC	CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGCTAAA	ACTCAAAGGA
851	ATTGACGGGG	ACCCGCACAA	GCGGCGGAGC	ATGCGGATTA	ATTCGATGCA
901	ACGCGAAGAA	CCTTACC AAG	GCTTGACATA	TACGAGAACG	GGCCAGAAAT
951	GGTCAACTCT	TTGGACACTC	GTAACAGGTT	GGTGCATGGT	TGTCGTCAGC
1001	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC	AACCCTCGTT
1051	CTATGTTGCC	AGCACGTTAT	GGTGGGAACT	CATGGGATAC	TGCCGGGGTC
1101	AACTCGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAA	TCATCATGCC	CCTTATGTCT
1151	TGGGCTTCAC	GCATGCTACA	ATGGCCGGTA	CAATGGGCAG	CGATACCGTG
1201	AGGTGGAGCG	AATCCCAAAA	AGCCGGTCCC	AGTTCGGATT	GAGGTCTGCA
1251	ACTCGACCTC	ATGAAGTCGG	AGTCGCTAGT	AATCGCAGAT	CAGCAACG

### *Mycobacterium* sp. P5-X1

1	CGTGCTTAAC	ACATGCAAGT	CGAACGGAAA	GGCCCTTCGG	GGTACTCGAG
51	TGGCGAACCG	GTGAGTAACA	CGTGGGTGAT	CTGCCCTGCA	C'TTTGGGATA
101	AGCCTGGGAA	ACTGGGTCTA	ATACCGAATA	TGACCACGCG	C'TTCATGGTG
151	TGTGGTGAA	AGCTTTTGCG	GTGTGGGATG	GGCCCGCGGC	CTATCAGCTT
201	GTTGGTGGGG	TAATGGCCTA	CCAAGGCGAC	GACGGGTAGC	CGGCCTGAGA
251	GGGTGACCGG	CCACACTGGG	ACTGAGATAC	GGCCCAGACT	CCTACGGGAG
301	GCAGCAGTGG	GGAATATTGC	ACAATGGGCG	CAAGCCTGAT	GCAGCGACGC
351	CGCGTGAGGG	ATGACGGCCT	TCGGGTTGTA	AACCTCTTTC	AATAGGGACG
401	AAGCGCAAGT	GACGGTACCT	ATAGAAGAAG	GACCGGCCAA	CTACGTGCCA
451	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG	GGTCCGAGCG	TTGTCCGGAA	TTACTGGGCG
501	TAAAGAGCTC	GTAGGTGGTT	TGTCGCGTTG	TTCGTGAAAA	CTCACAGCTT
551	AACTGTGGGC	GTGCGGGCGA	TACGGGCAGA	CTAGAGTACT	GCAGGGGAGA
601	CTGGAATTCC	TGGTGTAGCG	GTGGAATGCG	CAGATATCAG	GAGGAACACC
651	GGTGGCGAAG	GCGGGTCTCT	GGGCAGTAAC	TGACGCTGAG	GAGCGAAAGC
701	GTGGGGAGCG	AACAGGATTA	GATACCCTGG	TAGTCCACGC	CGTAAACGGT
751	GGGTACTAGG	TGTGGGTTTC	CTTCCTTGGG	ATCCGTGCCG	TAGCTAACGC
801	ATTAAGTACC	CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGCTAAA	ACTCAAAGGA
851	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	GCGGCGGAGC	ATGTGGATTA	ATTCGATGCA
901	ACGCGAAGAA	CCTTACCTGG	GTTTGACATG	CACAGGACGC	CGGTAGAGAT
951	ATCGGTTCCC	TTGTGGCCTG	TGTGCAGGTG	GTGCATGGCT	GTCGTCAGCT
1001	CGTGTCGTGA	GATGTTGGGT	TAAGTCCCGC	AACGAGCGCA	ACCCTTGTCT
1051	CATGTTGCCA	GCACGTTATG	GTGGGGACTC	GTGAGAGACT	GCCGGGGTCA
1101	ACTCGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAGT	CATCATGCCC	C'TTATGTCCA
1151	GGGCTTCACA	CATGCTACAA	TGGCCGGTAC	AAAGGGCTGC	GATGCCGTAA
1201	GGTGGAGCGA	ATCCTTTCAA	AGCCGGTCTC	AGTTCGGATC	GGGGTCTGCA
1251	ACTCGACCCC	GTGAAGTCGG	AGTCGCTAGT	AATCGCAG	

## Priloga A2

### Nukleotidno zaporedje gena za 16S rRNA bakterijskih izolatov, ugotovljeno z začetnim oligonukleotidom fD1

#### *Ochrobactrum* sp. P4-X5

```
1 ACATGCAAGT CGAGCGCCCC GCAAGGGGAG CGGCAGACGG GTGAGTAACG
51 CGTGGGAACG TACCTTTTGC TACGGAATAA CTCAGGGAAA CTTGTGCTAA
101 TACCGTATGT GCCCTTCGGG GGAAAGATTT ATCGGCAAAG GATCGGCCCCG
151 CGTTGGATTA GCTAGTTGGT GAGGTAAAGG CTCACCAAGG CGACGATCCA
201 TAGCTGGTCT GAGAGGATGA TCAGCCACAC TGGGACTGAG ACACGGCCCCA
251 GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATA TTGGACAATG GGCGCAAGCC
301 TGATCCAGCC ATGCCGCGTG AGTGATGAAG GCCCTAGGGT TGTAAGCTC
351 TTTCACCGGT GAAGATAATG ACGGTAACCG GAGAAGAAGC CCCGGCTAAC
401 TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG GGGCTAGCGT TGTTCGGATT
451 TACTGGGCGT AAAGCGCACG TAGGCGGACT TTTAAGTCAG GGGTAAAATC
501 CCGGGGCTCA ACCCCGGAAC TGCCTTTGAT ACTGGAAGTC TTGAGTATGG
551 TAGAGGTGAG TGGAAATCCG AGTGTAGAGG TGAAATTCGT AGATATTCGG
601 AGGAACACCA GTGGCGAAGG CCGCTCACTG GACCATTACT GACGCTGAGG
651 TGCAGAACCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC
701 GTAAACGATG AATGTTAGCC GTTGGGGAGT TTACTCTTCG GTGGCGCAGC
751 TAACGCATTA AACATTCCGC CTGG
```

#### *Stenotrophomonas* sp. P4-X3

```
1 ACATGCAAGT CGAACGGCAG CACAGTAAGA GCTTGCTCTT ACGGGTGGCG
51 AGTGGCGGAC GGGTGAGGAA TACATCGGAA TCTACTTTTT CGTGGGGGAT
101 AACGTAGGGA AACTTACGCT AATACCGCAT ACGACCTTCG GGTGAAAGCA
151 GGGGACCTTC GGGCCTTGCG CGATTGAATG AGCCGATGTC GGATTAGCTA
201 GTTGGCGGGG TAAAGGCCCA CCAAGGCGAC GATCCGTAGC TGGTCTGAGA
251 GGATGATCAG CCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTACGGGAG
301 GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAATGGGCG CAAGCCTGAT CCAGCCATAC
351 CGCGTGGGTG AAGAAGGCCT TCGGGTTGTA AAGCCCTTTT GTTGGGAAAG
401 AAAAGCAACT GGTTAATACC CGGTTGTTCT GACGGTACCC AAAGAATAAG
451 CACCGGCTAA CTTCGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGAAG GGTGCAAGCG
501 TTACTCGGAA TTACTGGGCG TAAAGCGTGC GTAGGTGGTT GTTTAAGTCT
551 GTTGTGAAAG CCCTGGGCTC AACCTGGGAA CTGCAGTGGA AACTGGGCAA
601 CTAGAGTGTG GTAGAGGGTA GCGGAATTC
```

#### *Stenotrophomonas* sp. P4-X6

```
1 ATGCAAGTCG AACGGCAGCA CAGTAAGAGC TTGCTCTTAC GGGTGGCGAG
51 TGGCGGACGG GTGAGGAATA CATCGGAATC TACTTTTTTCG TGGGGGATAA
101 CGTAGGGAAA CTTACGCTAA TACCGCATA CACCTTCGGG TGAAAGCAGG
151 GGACCTTCGG GCCTTGCGCG ATTGAATGAG CCGATGTCGG ATTAGCTAGT
201 TGGCGGGGTA AAGGCCACC AAGGCGACGA TCCGTAGCTG GTCTGAGAGG
251 ATGATCAGCC ACACTGGAAC TGAGACACGG TCCAGACTCC TACGGGAGGC
301 AGCAGTGGGG AATATTGGAC AATGGGCGCA AGCCTGATCC AGCCATACCG
351 CGTGGGTGAA GAAGGCCTTC GGGTTGTAAA GCCCTTTTGT TGGGAAAGAA
401 AAGCAACTGG TTAATACCCG GTTGTCTTGA CCGTACCCAA AGAATAAGCA
451 CCGGCTAACT TCGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGAAGGG TGCAAGCGTT
501 ACTCGGAATT ACTGGGCGTA AAGCGTGCCT AGGTGGTTGT TTAARTCTGT
551 TGTGAAAGCC CTGGGCTCAA CCTGGGAACT GCAGTGGAAA CTGGGCAACT
601 AGAGTGTGGK AGAGGG
```

### *Stenotrophomonas* sp. P6a-Z3

```

1   CATGCAAGTC GAACGGCAGC ACAGTAAGAG CTTGCTCTTA CGGGTGGCGA
51  GTGGCGGACG GGTGAGGAAT ACATCGGAAT CTACTTTTTTC GTGGGGGATA
101 ACGTAGGGAA ACTTACGCTA ATACCGCATA CGACCTTCGG GTGAAAGCAG
151 GGGACCTTCG GGCCTTGCGC GATTGAATGA GCCGATGTCG GATTAGCTAG
201 TTGGCGGGGT AAAGGCCAC CAAGGCGACG ATCCGTAGCT GGTCTGAGAG
251 GATGATCAGC CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG
301 CAGCAGTGGG GAATATTGGA CAATGGGCGC AAGCCTGATC CAGCCATACC
351 GCGTGGGTGA AGAAGGCCTT CGGGTTGTAA AGCCCTTTTG TTGGGAAAGA
401 AAAGCAACTG GTTAATACCC GGTTGTTCTG ACGGTACCCA AAGAATAAGC
451 ACCGGCTAAC TTCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGAAGG GTGCAAGCGT
501 TACTCGGAAT TACTGGGCGT AAAGCGTGCG TAGGTGGTTG TTTAAGTCTG
551 TTGTGAAAGC CCTGGGCTCA ACCTGGGAAC TGCAGTGGAA ACTGGGCAAC
601 TAGAGTGTGG TAGAGGGTAG CGGAATTCCC GGTGTAGCAG TGAAATGCGT
651 AGAGATCGGG AGGAACATCC ATGGCGAAGG CAGCTACCTG GACCAACACT
701 GACACTGAGG CACGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTG
    
```

### *Stenotrophomonas* sp. P6a-Z4

```

1   ACATGCAAGT CGAACGGCAG CACAGTAAGA GCTTGCTCTT ACGGGTGGCG
51  AGTGCGGACG GGGTGAGGAA TACATCGGAA TCTACTTTTTT CGTGGGGGAT
101 AACGTAGGGA AACTTACGCT AATACCGCAT ACGACCTTCG GGTGAAAGCA
151 GGGACCTTCG GGGCCTTGCG CGATTGAATG AGCCGATGTC GGATTAGCTA
201 GTTGGCGGGG TAAAGGCCCA CCAAGGCGAC GATCCGTAGC TGGTCTGAGA
251 GGATGATCAG CCACACTGGA ACTGAGACAC GGTCCAGACT CCTACGGGAG
301 GCAGCAGTGG GGAATATTGG ACAAATGGGCG CAAGCCTGAT CCAGCCATAC
351 CGCGTGGGTG AAGAAGGCCT TCGGGTTGTA AAGCCCTTTT GTTGGGAAAG
401 AAAAGCAACT GGTTAATACC CGGTTGTTCT GACGGTACCC AAAGAATAAG
451 CACCGGCTAA CTTCGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGAAG GGTGCAAGCG
501 TTACTCGGAA TTACTGGGCG TAAAGCGTGC GTAGGTGGTT GTTTAAGTCT
551 GTTGTGAAAG CCCTGGGCTC AACCTGGGAA CTGCAGTGGG AACTGGGCAA
601 CTAGAGTGTG GTAGAGGGTA GCGGAATTCC CGGTGTAGCA GTGAAAATCC
651 TAGAGATCGG GAGGAACATC CATGGCGAAG GCAGCTACCT GGACAAACAC
701 TGACACTGAG GCACGAAAGC GTGGGGAGCA AACAGGATTA GATACCCTGG
751 TAGTCCACGC CCTAAACGAT GCGAACTGGA TGTGGGTGTC ACTTTGGCAC
801 GCAGTATCGA AGCTAACGCG TTAAGT
    
```

### *Micrococcus* sp. P2-S5

```

1   CATGCAAGTC GAACGATGAA GCCCAGCTTG CTGGGTGGAT TAGTGGCGAA
51  CGGGTGAGTA ACACGTGAGT AACCTGCCCT TAACCTGTTG ATAAGCCTGG
101 GAAACTGGGT CTAATACCGG ATAGGAGCGT CCACCGCATG GTGGGTGTTG
151 GAAAGATTTA TCGGTTTTGG ATGGACTCGC GCCTATCAG CTTGTTGGT
201 AGGTAATGGC TCACCAAGGC GACGACGGGT AGCCGGCCTG AGAGGGTGAC
251 CGGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG
301 TGGGGAATAT TGCACAATGG GCGNAAGCCT GATGCAGCGA CGCCGCGTGA
351 GGGATGACGG CCTTCGGGTT GTAAACCTCT TTCAGTAGGG AAGAAGCGAA
401 AGTGACGGTA CCTGCAGAAG AAGCACCGGC TAACCTACGT CCAGCAGCCG
451 CGGTAATACG TAGGGTGCGA GCGTTATCCG GAATTATTGG GCGTAAAGAG
501 CTCGTAGGCG GTTTGTGCGC TCTGTGCTGA AAGTCCGGGG CTTAACCCCG
551 GATCTGCGGT GGGTACGGGC AGACTAGAGT GCAGTAGGGG AGACTGGAAT
601 TCCTGGTGTA GCGGTGGAAT GCGCAGATAT CAGGAGGAAC ACCGATGGCG
651 AAGGCAGGTC TCTGGGCTGT AACTGACGCT GAGGAGCGAA AGCATGGGGA
701 GCGAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA TGCCGTAAC GTTGGGCACT
    
```

751 AGGTGTGGGG ACCATTCCAC GGTTTCCGCG CCGCAGCTAA CGCATTAAGT  
801 GCCCCGCCTG G

### *Brevibacterium* sp. P3-Z2

1 CATGCAAGTC GAACGCTGAA GCCGACAGCT TGCTGTTGGT GGATGAGTGG  
51 CGAACGGGTG AGTAACACGT GAGTAACCTG CCCCTGATTT CGGGATAAGC  
101 CTGGGAAACT GGGTCTAATA CCGGATACGA CCAATCCTTG CATGAGGGTT  
151 GGTGGAAAGT TTTTCGATCG GGGATGGGCT CGCGGCCTAT CAGCTTGTGT  
201 GTGGGGTAAT GGCTACCAA GGCACGACG GGTAGCCGGC CTGAGAGGGC  
251 GACCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG  
301 CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGGGAAAC CCTGATGCAG CGACGCAGCG  
351 TGCGGGATGA CGGCCTTCGG GTTGTAACC GCTTTCAGCA GGAAGAAGC  
401 GAAAGTGACG GTACCTGCAG AAGAAGTACC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG  
451 CCGCGGTAAT ACGTAGGGTA CGAGCGTTGT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA  
501 GAGCTCGTAG GTGGTTGGTC ACGTCTGCTG TGGAAACGCA ACGCTTAACG  
551 TTGCGCGTGC AGTGGGTACG GGCTGACTAG AGTGCAGTAG GGGAGTCTGG  
601 AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGCAGA TATCAGGAGG AACACCGGTG  
651 GCGAAGCGG GACTCTGGGC TGTAACCTGAC ACTGAGGAGC GAAAGCATGG  
701 GGAGCGAACA GGATTAGATA CCCTGGTAGT CCATGCCGTA AACGTTGGGC  
751 ACTAGGTGTG GGGGACATTC CACGTTCTCC GCGCCGTA

### *Microbacterium* sp. P4-S3

1 CATGCAAGTC GAACGGTGAA GCAGGAGCTT GCTCTTGTGG ATCAGTGGCG  
51 AACGGGTGAG TAACACGTGA GCAACCTGCC CCGGACTCTG GGATAAGCGC  
101 TGGAAACGGC GTCTAATACT GGATACGAGT AGCGACCGCA TGGTCAGCTA  
151 TTGAAAGAA TTTTCGGTCTG GGATGGGCTC GCGGCCTATC AGCTTGTGTG  
201 TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGTCGACGG GTAGCCGGCC TGAGAGGGTG  
251 ACCGGCCACA CTGGGACTGA GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC  
301 AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGAAAGC CTGATGCAGC AACGCCGCGT  
351 GAGGGATGAC GGCCTTCGGG TTGTAAACCT CTTTTAGTAG GGAAGAAGCG  
401 AAAGTGACGG TACCTGCAGA AAAAGCGCCG GCTAACTACG TGCCAGCAGC  
451 CGCGGTAATA CGTAGGGCGC AAGCGTTATC CGGAATTATT GGGCGTAAAG  
501 AGCTCGTAGG CGGTTTGTCG CGTCTGCTGT GAAATCTGGG GGCTCAACCC  
551 CCAGCTGCA GTGGGTACGG GCAGACTAGA GTGCGGTAGG GGAGATTGGA  
601 ATTCTGTGTG TAGCGGTGGA ATGCGCAGAT ATCAGGAGGA ACACCGTAGG  
651 CGAAGCAGA TCTCTGGGCC GTAACCTGACG CTGAGGAGCG AAAGGGTGGG  
701 GAGCAAACAG GCTTAGATAC CCTGGTAGTC CACCCCGTAA ACGTTGGGAA  
751 CTAGTTGTGG GGTCCATTCC ACGGATTCCG TGACGCAGCT AACGCATTAA  
801 GTTCCCCGCC TGGGGAGTAC GGCCGCAAGG CTAAAACCTCA AAGGAATTGA  
851 CGGGGAC

### *Microbacterium* sp. P3-Z5

1 CATGCAAGTC GAACGATGAA CCAGGTGCTT GCACTTGGGG ATTAGTGGCG  
51 AACGGGTGAG TAACACGTGA GCAACCTGCC CCTGACTCTG GGATAAGCGC  
101 TGGAAACGGT GTCTAATACT GGATACGAAC AAGAATCGCA TGGTTACTTG  
151 TTGAAAGAT TTTTGGTTG GGGATGGGCT CGCGGCCTAT CAGCTTGTGT  
201 GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GGCCTCGACG GGTAGCCGGC CTGAGAGGGT  
251 GACCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG  
301 CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGGAAG CCTGATGCAG CAACGCCGCG  
351 TGAGGGATGA CGGCCTTCGG GTTGTAACC TCTTTTAGCA GGAAGAAGC  
401 GAGAGTGACG GTACCTGCAG AAAAAGCGCC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG  
451 CCGCGGTAAT ACGTAGGGCG CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA  
501 GAGCTCGTAG GCGTTTGTG GCGTCTGCTG TGAAATCCCG AGGCTCAACT

```
551 TCGGGTCTGC AGTGGGTACG GGCAGACTAG AGTGCGGTAG GGGAGATTGG
601 AATTCCTGGT GTAGCGGTGG AATGCGCAGA TATCAGGAGG AACACCGATG
651 GCGAAGGCAG ATCTCTGGGC CGTAACTGAC GCTGAGGAGC GAAAGGGTGG
701 GGAGCAAACA GGCTTAGATA CCCTGGTAGT CCACCCCGTA AACGTTGGGA
751 ACTAGTTGTG GGGTCCATTC CACGGATTCC GTGACGCAGC TAACGCATTA
801 AGTTCC
```

### *Microbacterium* sp. P3-Z6

```
1 CATGCAAGTC GAACGATGAA CCCGGGGCTT GCTCTGGGGG ATTAGTGGCG
51 AACGGGTGAG TAACACGTGA GCAACCTGCC CCTGACTCTG GGATAAGCGC
101 TGGAAACGGC GTCTAATACT GGATACGAGT AGTGATCGCA TGGTCAGCTA
151 CTGAAAAGAT TTTTTGGTTG GGGATGGGCT CGCGGCCTAT CAGCTTGTTG
201 GTGAGGTAAT GGCTCACCAA GGCCTCGACG GGTAGCCGGC CTGAGAGGGT
251 GACCGGCCAC ACTGGGACTG AGACACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG
301 CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGGAAG CCTGATGCAG CAACGCCGCG
351 TGAGGGATGA CGGCCTTCGG GTTGTAAACC TCTTTTAGCA GGAAGAAGC
401 GAAAGTGACG GTACCTGCAG AAAAAGCGCC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG
451 CCGCGGTAAT ACGTAGGGCG CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA
501 GAGCTCGTAG GCGGTTTGTG GCGTCTGCTG TAAAATCCCG AGGCTCAACC
551 TCGGGCCTGC AGTGGGTACG GGCAGACTAG AGTGCGGTAG GGGAGATTGG
601 AATTCCTGGT GTAGCGGTGG AA
```



## Priloga B

### Nukleotidno zaporedje 11,3 kbp dolgega fragmenta *PstI* v klonu pHEM

```

1   CTGGGCGCTG CTGCCTGCCG GTTGCGCCAG GCGCTGTCTC GCACGTTGCA
51  AGGTGGCGGC AAATCGCTCG CGGCTGAAGG GCTTGACCAG GTAATCCACC
101 GCGTTGGCCT CGAACGCCTT CACCGCGTGC TGTTTCGTAAG CCGTCACGAA
151 GACGGTGGCC GGCATGCGTT CTGCGCCAAT CGTCGCCACC ACGTCCAGCC
201 CGGTGATCGC GGGCATCTGG ATGTCCAGGA ACACCAGGTC CGGGGATTGT
251 TCGCGAATGG CTCTCACTGC CGAAACGCCA TCGCCGCATT CGCCGATCAG
301 CGCCAGCGCC GGATCTTCGG CGAGCAGCCG TACGATCGCC CGTCGGGCGA
351 TCGGCTCATC GTCCACCACC AGTACCCTGA TGCTCAGGCC TGCGGACTC
401 CGGCACTGAA TTATGGTTCG TCGTCGATGG GGGCGAGCTC GCGGAACGGC
451 AGCCGCACGC GGCACGCCAC GCCTTCGGGC CAGAGCATAT CCAGGCGTAC
501 GTCGGCGGCC TCGCCGTACA GTTCCTTCAG CCGCAGACGG GTGTTGGACA
551 TGCCGATGCC GTGGCCCTTC GGCGCAGCGG GGCCGGGTTT CAGCGTGCTG
601 TTGCGGTTGC GGACTTCGAT GCACAGCGTG TCGCCGTACG GCGGGGTCTC
651 GATTTCCACC ACGTCCCCGC CGACGCGCTG GCCGATGCCA TGGCGCAGCG
701 CGTTTTCCAC CAGCGGCTGC AGCAGCTGTT TGACCTCGGT CTGGAAGCCC
751 AGGGTCTCTT TGTGGGTCTG CTCGGTCATG CGACGGTACT CCTTGACTAC
801 GGTGGCGCGC GGTGCGCGGC GGCTGGCTCA AGGGGTAGGG ATCGATTGTC
851 CCGATTTCAA GCGGCGGGCG TTTCAAATTC TACGTACTGG GGAGGCCGCC
901 GGGCAGCCCC GCTCCGGGAC ACGCCGGGTC CGGAATGAAA GGCAACGCCG
951 GTAGCGCCGG CCGTTGGCCG GCCCTCATGA GTCTGCGGCG GCGCGGTATC
1001 CTTACACAT GAAAGCGCGT TCTTCTGCCT CACCTACTAT CGGCCAGGTC
1051 CGCATCATCG GCGGCAAATG GCGCAACACC AAGCTGCCGG TACCCTGGC
1101 GCCCAGCCTG CGGCCAGCA GCGACAGGGT CCGCGAGACC GTTTCAACT
1151 GGCTGATGCC GCGCTGGGC GGGGCCCGGG TGCTGGACCT GTTCGCGGGC
1201 AGCGGAGCGC TGGGGCTGGA GGCCATTTTCG CGCGGCGCCG CCCACGCCAC
1251 CCTGGTTCGAG CGCGACGCGG CGCTGGCCCG GCAGTTGCGG GAGTCGGTGG
1301 CCAAGCTGGG CGCGCAGGCG CAGGTCGAGG TGGTCCAGGC CGATGCGCTG
1351 CACTGGCTGG GCCAGCGCCC GTCGGGGCTG GCCGACATCG CCTTCGTCGA
1401 TCCCCCTTC GCCGACGGGC TCTGGGAGGC GGTGCTGGCC GGGCTGGGGC
1451 CGCACCTGGC CGCCGATGCC TGGCTGTACC TGGAGTCGCC GGCCGGGCAG
1501 ACCCTGCGGC TGCCGCCGGG CTGGCTGCTG CACCGGGAGG GCGGCACCCG
1551 CGAGGTCGGC TTTGCCCTGT ACCGGCGCGC CACTGCTACA CTTTCACCAG
1601 ATCAGAACGC GTAGCTTCCG CATGACCGTA GCCAACCGCC GCATCGCCGT
1651 ATACCCGGGC ACCTTCGATC CGATCACCAA CGGTCACATC GACCTGGTGA
1701 ACCGGGCCCGC GCCGTTGTTT GAGAAGCTGG TGGTTGGCGT GGCGCAGAGC
1751 CCTTCGAAAG GCCCTCGCT GCCGCTGGAG CTGCGGGTGT CGCTGGCGCG
1801 GGACGCGCTG GCCACCACC GCAATGTGGA AGTACGCGGC TTCGACACCC
1851 TGCTGGCACA CTTCTGTGCG TCGGAGCAGG GGGGGTGTGT GCTGCGCGGG
1901 CTGCGCGCGG TGTCCGATTT TGAATATGAA TTCCAGATGG CGAGCATGAA
1951 CGCCACCTG ATTCGGGAG TCGAGACCCT GTTCTGACC CCGCCGAGC
2001 AGCACAGCTT CATTTCGTCC TCGCTGGTCC GCGAGATCGC CGCCCTTGGT
2051 GGTGACGTGT CCGGCTTCGT GCCGGCCTCG GTGCTCGAGG CGCTGCGCAA
2101 GGTCCGCGAA GCGAAGTCGG GCCCGTCGTA AACCCAAGAC CCACACATAC
2151 CAAGAAATCAC CAAGAGGGAG ACTCCATGAA CAACACCATG CGTGCCATGT
2201 TGATCGCGTC GTTCGCGCTG GCCTTCACCG CCTGCAAGAA GGAAGAAGCC
2251 GCGCCGGTTC CCGAAGCCCA GCAGGCGCTC GTCGCCCCGG CCAAGGACGA
2301 CGATGCGGGC TGGAAAAAGT ACCTGCAGCG CTACACCGTG TACCCCAAGA
2351 CCCACTACGC CACCACGCGC GAGCGGGTGC TGTCGGCGGT GGATACGATC
2401 AAGGCCGAGC TCAAGGTGCG GCTGGAACAG CTGTACGAGC AGAACAAGCT
2451 GGTGGAAGCG CAGCGCCTGG CGCAGCGCAC CCAGTTCGAC CTGGAAATGA
2501 TGGCCGAGGT CGGCTTCTGC AACGGCATCG AAAACTACTC GCGGCATCTC
2551 ACTGGTAAAG CCGCCGGCGA GCCGCCGCCG ACCCTGTTTC ACTACCTGCC
2601 GCCGGATGCG CTGCTGGTGA TCGACGAATC GCACGTGACC ATTCGCGAGA
2651 TCGGCGCCAT GTACAAGGGT GACCGCTCGC GCAAGGAAAC CCTGGTTCGAG

```

2701 TTCGGCTTCC GGCTGCCTTC GGCGCTGGAC AACCGCCCGC TGCCTTCGA  
 2751 GGAATGGGAA GCGCGCTGCC CGCGCAGCAT CTACGTGTCC GCCACGCCGG  
 2801 GGCCGTATGA GCTGCGCGAA GCGGCCGATG AAATCACCGA GCTGGTGGTG  
 2851 CGCCGACCG GCCTGATCGA CCCGGTGGTG GAGATCCGTC CCGTGGGTAC  
 2901 GCAGGTCGAC GACCTGATGA GCGAGGTCAA CGAACGCATC AAGCTGGGCG  
 2951 ACCGCGTGCT GGTCAACCAG TTGACCAAGC GCATGGCCGA AAACCTCACC  
 3001 GAGTACCTCA CCGAACACGG CATCCGCGTG CGCTACCTGC ATTCGGATAT  
 3051 CGACACCGTC GAGCGCGTGG AGATCATCCG TGACCTGCGC CTGGGCAAGT  
 3101 TCGACGTGCT GGTGGGCATC AACCTGCTGC GCGAAGGCCT GGACATGCCC  
 3151 GAAGTGTCGC TGGTAGCGAT CCTGGACGCG GACAAGGAAG GCTTCCTGCG  
 3201 TTCGACTGGT TCGCTGATCC AGACCATCGG TCGTGCCGCA CGCAACCTGC  
 3251 GTGGCAAGGC GATCCTGTAT GCGGACAAGA TCACCCGCTC GATGCAGGCG  
 3301 GCGATCGATG AAACCGACCG CCGCCGTGCC AAGCAGGTGG AATAACAACA  
 3351 AGCGCACGGG ATCGTGCCCA AGTCGGTGCT GCGCCCGATC GTGGACGTGC  
 3401 TGAAGGCGC ACGTTCGGAA GCGGCCGAAA AGGAAGCGCG TGGCAAGGCG  
 3451 AAGGCCGCG GCGGCCGCGT CGCCGAGGAA GCGGTGGATT ACCGACCGCT  
 3501 GGAACCGGCA CAGATCGCCA AGCGATTGCA GGCGCTGGAA CAGCAGATGT  
 3551 ACCAGCACGC CCGTGACCTG GAGTTCGAAG ATGCCGCCCG CGTGCGCGAC  
 3601 CAGATCCGCC GGTGAAGGA GGCCAGCCTG GGCTGAACAA CGCGTTGTGA  
 3651 AATACCTTCA CAAAAGTGTT GCTCTTCACA CCCGACGTCC GTAATATACG  
 3701 CGGCCTGCCC CGGCGCAATT GTGGCGGCGC AGCGAGAAAA ACGGGCGGTT  
 3751 AGCTCAGCGG TAGAGCACTA CCTTGACATG GTAGGGGTCA CAGGTTTCGAA  
 3801 CCCTGTACCG CCCACCACTC CAGTCCCAGC GACTGCGGTG GAACAACAGA  
 3851 AAAGCCGCC ATCAGGTCGG CTTTTTTGCG TTGTGGATTT CGCCCAGCGG  
 3901 CGCTTTCCGA CAACACACTC CGCGCACGCC TGATGGCGAC CTTGGCGCCG  
 3951 CGGGCCAAAC ATGCAGGTTT CAGCACGTGG TGCCCTGCAT GTCGTTCCCTG  
 4001 TCGAACTTCC TCTCCCGTTC GTTTTCCGTG TCCCTGCCCC TGTGCGGCAA  
 4051 GGCATGTGCG GCCGCGTTGC TGGTGGGGGT GTGCGCCGTG GTGTTTCGCAC  
 4101 CGGTGCTGCT TGCCCCGTTG CCTGCAATGGT GCGCACTGGT CTGTGGGGCG  
 4151 GGGGTGTGGT GCGGATGGCC GCGCGCGCGA TGGTTCGGCG CATTGTGAC  
 4201 CGGCATGGGC TGGGTGACCC TGCATGCGCA TCGGGTCTG GCCCTGCAGC  
 4251 GGCTGGTGA CCTACGTCTA CCGGAAATG CTGGACCTGA AGTCCGCCG  
 4301 TACCTCGCGC GACCTGGCGG GGTACAGGG CCCGAAGATC GATCCGAAGC  
 4351 GGCTGGCGCC GGGCGACCTG GTGTTCTTCG GCAACCGCGG CAACGTTTTTC  
 4401 CACGTGGGCA TCTATGTGGG CGAAGGGCGC TTCGTGCATG CCCCAGCAC  
 4451 CGGCGGAAAC GTCCGCCCTG ATTCGCTCGG CGGCAGCTAC TGGAAGGAGC  
 4501 ACTACACGGG CGCGAAACGT GTTCTTCACT GAAATGAACA GGCGGAAGGT  
 4551 CCATAAATGA GACATTCATC ACATTTACAT TAACCAATAT TTAACGAAAT  
 4601 TTGTACCAAA TCACACGTAT TACACGGCAT CATCACCCAT CGTTTTTTTTT  
 4651 CAGTGACCGC CGCGTGACGA CAGCCGACCT GACGTGCCAA GGCCAGACCG  
 4701 CCACCTTCCG GCGCACCGCC CGCCCCGCTC TTCTCGCTTT CGCCCTCTGC  
 4751 GTGGCCAGCC TTCCGGCCTG GGCGCAGACG GCACCGACGC CCCTCGTCTGA  
 4801 TACTGCTCCG GTTGCCACCG TCGCCGCTGT CGAGACCCCT GCCGCCGCCA  
 4851 AGGCCGAGGC GCCGGCCCGC AGCAAGGCCG ATGCCGCTGC CAGCGCCACC  
 4901 CTCGCCGCC TGCTTCCGCA CCTGGCAGCG AACGACTCGA TTCCGCTCAT  
 4951 GGACCGTTCG GCGATGTTCG CCGGCGATCT GAGCCGCTG CTGGCCAACCT  
 5001 ACGATGCAAG CTCCGGCGCC AACGGTTCGG TGGTTGGCGG CGCTGCCGAC  
 5051 AACGGCAAGG TGCAGTCGCT GCTGCGGCGT GCGATGACCC TGCTGGGCAC  
 5101 CCCGTACCG TGGGGCGGTA CCTCGCCGGA CAGCGGTTTC GACTGCAGGT  
 5151 CAGCCGCCAG GATTACCGC AGCGCGGCGT GGTGCGCTAC ATCGATACCG  
 5201 AACAGGACAA CCAGGCCACG GCCTGGCAAC GTTTCCTGGC CAGCGGGCCG  
 5251 TTGGCGGTGC TGCCCCGCCG CGCGCGACGC AGCTCCATCG TATGGACGCT  
 5301 GCCCCGATGCC GAGGCCGAGC GCGTGCTGGC GCTGGACGAA GCCACCTTCA  
 5351 ACGCCGAGCT GACCCGCGCC TTCGGCGCCC GGTGGGGTGC GATGACGCTT  
 5401 GCTTCGCGTC GCGCCGCTT CCCGCTGCGT CGTCAACTGG TCAGTGCCTA  
 5451 CGTGGCCGGC CGTGTGCTGG CGCTGGGCGA CGCGGCGCAT GTGGTGCACC  
 5501 CCTTGGCCGG GCAGGGCGTG AACCTGGGCC TCGCGACGCT GGCGGCGCTG  
 5551 CATGCCCTGG TGCTGCGCGC ACAGCAGCGG CGGCAGGACT GGGCCTCGCC

---

5601	CGATCGCCTG	CAGCTGAAGC	AGCATGACGA	GCTGGAGGTC	CAGGACATCA
5651	ATGCGCAGGG	CGTGTCCGGG	CAGGGTCCCT	CGGGTGCGGT	GCCCAAGGAC
5701	ATGAGTATTT	CCCAGCTCAA	TGAAGCCACC	TTCGCCAAGC	AGCTGGCCCA
5751	GCAGCTGAAC	GACGATGCCC	TGAACAACCG	CTACAGGCAC	CTGATCCTGA
5801	TCGCCGACCC	GAAAACGCTC	GGCCATATCC	GTCCGCAGCT	GCACAAGGAA
5851	GTCGAGACGC	GCCTGCTGAA	GGACATCGCC	AAAGACTTCA	CCAATGCCAC
5901	GCTGGAAGAT	ATCCAGCGTG	CCCTGGCAGC	CTGAGCCATG	GCATACGCGC
5951	GCACCTTTAC	CCAGTTTCCG	GAGCCGACCC	GCGCCGAGGT	GGAAGCCGGC
6001	GCGGGCTGGC	AGCTGCTGGA	ATTTCGGCACG	GACTGGTGCG	GCCATTGCGT
6051	TGCCCGCAG	CCGGTGGTCA	AGGGCTTCGT	TGAGGGCCAC	GACCTTGACC
6101	ACCGCAAGGT	CGAGGACGGC	AAGGGGCGCC	CGCTGGGGCG	CGCCTTCGAG
6151	GTCAAGCTCT	GGCCGACCC	GGTCCCTGCTG	CGCGATGGGC	AGGAGGTGGC
6201	GCGGGTGGTA	CGCCCGACCG	CAACCGACGA	TCTTGGCCCG	CTCGAAAGCG
6251	CGCTGACGTA	GATGAATATC	CCTTAATTCC	CAATTTAACC	AAAAAGGGTA
6301	TAGTGGCCAC	ATCCCTCCG	TGGATGTCCG	TCATGAGCCT	GCCCTGGAT
6351	GTTCCAGGCC	TGAAAAAGGC	CACTGCGTCA	TCGGTGAAGA	CCCCTGGCTG
6401	GCCGAGCCTG	ATGCGCACCG	TGCGCGAGAA	GCAGGCACTG	GTGATCACCA
6451	ACCACAACCA	CCCTGAAGCG	GTGATCGTGG	ACATCAAGGC	CTACCAGGAA
6501	CTGCTGGCCC	GCGCCGCCGG	CAACCCCGAT	GACACCCGCC	AAGGGGAGCT
6551	GGACCGCCTT	CGCGCGGAGT	TCGATACCAC	CTTGGCCAGT	CTGAAGGGTG
6601	ACGGGGGCCT	GGGCAGGGTG	TTGGGGCCAGC	CGATCCGTCG	CGGGCGCAA
6651	ACCGCCCTTG	GCCCGTCGCT	CTGATCGGTG	GCGCGGATAC	TGGTACTGGC
6701	CGGCGTCAAT	GGCGCCGGTA	AAAGCTCGCT	GCTGGGTACC	TGGCTGCGCG
6751	AGGCCGGGCT	GACCTGGTTC	AACCCGGACA	GCTTCACCCG	GCGCCTGGCG
6801	GAGCAGGGCT	GGCCGCTGGA	TGAGGCCAAC	GCGGCGGCAT	GGAGCGAGGG
6851	CGCGCGGCGG	CTGCGCCAGG	CGATGAGCGA	TGGCACCGAT	TTCGCGTTTCG
6901	AAACCACGCT	CGGCGGCAAC	ACCATTCCAC	GCCTGCTGCG	CGATGCCTGC
6951	CGCACCCACG	ACGTGGCGAT	ATGGTTCTGT	GGCCTGCACA	GCGTGGCGCT
7001	GCACATCGAA	CGCGTGGCGG	ATCGGGTCAG	CCAGGGCGGT	CACGATATCC
7051	CGCACGACAA	GATCCGCGCG	CGTTTCGATT	CCGCGCGTGA	GAATCTGATC
7101	GCACTGCTGC	CACATCTTGC	CGAGTTGCAT	GTGTACGACA	ACAGCGCACC
7151	GGCCGATGCA	AAGGGCAGGG	CGGCACCGCT	GCCGCTGCTG	CAGCTTGACC
7201	GCGAGGGATT	GCACTTCCCG	GTGACCGTGA	TCGACTGCTG	CGAGACCCCG
7251	GACTGGGCCA	AGCCGATCGT	CATGCGTGCA	ATGGAGTTGC	ACGCAAGAAC
7301	GTAACGCGAC	CCCCTGAAAA	ACGCCTTGAA	ACAAGGTGTT	TCATCGACAT
7351	GTGAAGAATC	GATAGAGGTC	GCATGCACAC	ATTGTGGTAA	CATGGTGC
7401	TGATCATTGC	CTCGGGCCAT	TGCCCGTCTC	TCGGTCATCC	TTCCTGCAGC
7451	GCCGTGGTGT	ACCTCGCGGC	CGTCCGGGAA	CGCCTGTTGC	TCCCCTCTTC
7501	GCGCATCGTG	CCGCGTTCTT	CCGGAGGCGG	TGTTTTCTCTG	TGCCTTGCGC
7551	GGGACCTCGG	GTGTGTTGAT	GGCCCTGCTT	CCAGGAGAAA	GCAGATGCAG
7601	GAAGTGCATG	CCGCACACGC	CCATTTCCGG	TGGTTCAAGC	GCCGCCGCCA
7651	GATGAACGTC	GACGAAGTCA	CCGTGGTCTGA	CCGCCCATG	CTCAAGAAAG
7701	CCGTCGGTGC	CGCCGCGCTT	GGCAACGCGA	TGGAATGGTT	CGATTTCCGGC
7751	GTCTACGGCT	ATCTCGCGGT	CACCCTGGGC	CAGGTGTTCT	TTCCCGCCAG
7801	CAGCCCAGAC	GCGCAGCTGA	TCGCCACCTT	TGCCACGTTT	ACCGTGGCGT
7851	TCCTGGTGCG	CCCCTGGGGC	GGGCTGGTGT	TCGGCCCGCT	GGGTGACCGC
7901	TACGGCCGCC	AGAAAAGTGCT	GGCCTTACC	ATGATCCTGA	TGGCGCTGGG
7951	CACCTTCAGC	ATTGGCCTGA	TTCCGTCCCTA	CGGCAGCATC	GGCATGTGGG
8001	CACCGGCATT	GCTGCTGCTC	GCACGGCTCG	TGCAGGGCTT	CTCCACCGGC
8051	GGCGAATACG	GTGGGGCGGC	GACCTTCATC	GCCGAATATT	CCACCACCG
8101	CAACCCGCGC	CTGATGGGCA	GCTGGCTCGA	ATTCCGGCACG	CTGGGCGGTT
8151	ACATCGCCGG	TGCCGCCACC	GTGACCGTGC	TGCACATGGC	ACTGAGCAGC
8201	ACGCAGATGC	TGGACTGGGG	CTGGCGCCTG	CCGTTCCCTGA	TCGCCGGCCC
8251	GCTGGGGCTG	CTTGGCCTGT	ACATGCGCAT	GAAGCTGGAA	GAAACCCCGG
8301	CCTTCCGCGC	CTACGCAGAA	GAGGCCGACA	AGCGCGACCA	CGAGCGCCCC
8351	GGCCTGGGCG	CGTTGCTGCG	CGTGCATTGG	CCGCAGCTGC	TCAAGTGC
8401	GGGCCTGGTG	CTGGTGTTC	ACGTCACCGA	TTACATGCTG	CTGACCTACA
8451	TGCCAGCTA	CCTCAGCGTG	ACCATGGGCT	ATGCCGAGAG	CAAGGGCCTG

---

8501	CTGCTGATCA	TCATCGTGAT	GCTGGTGATG	ATGCCGCTCA	ACGTGGTGGG
8551	CGGGCTGTTC	AGTGACCGGC	TGGGGCGCCG	GCCGATGATC	ATCGGTGCGT
8601	GCATCGCGCT	GTTTCGCGCTG	GCCATTCCGT	GCCTGCTGCT	GGTTGGCAGC
8651	GGTCATGACG	GGTTGATCTT	CCTGGGCCCTG	ATGCTGCTCG	GCCTGGCGCT
8701	GGTGTGTTTC	ACCAGCTCGA	TGCCCTCCAC	GCTGCCGGCG	CTGTTCTATA
8751	CCCCGGTACG	CTACAGCGCG	TTGTTCGATTG	CCTTCAATGT	GTGGTCTCA
8801	CTGTTTCGGCG	GCACCACACC	GCTGATCACC	GCCTGGCTGG	TCGAGCGCAC
8851	CGGCGACCCA	CTGGTGCCGG	CGTATTACCT	GATGGGCGCG	GCGGTGATCG
8901	GCCTGGTCAC	CATGCTGTTC	GTCAATGAAA	CCGCCAACCT	GCCGCTGCGC
8951	GGCTCGCCGC	CGGCCGTGGC	CAGCGAAGCC	GAAGCCCACG	CGCTGCTGCG
9001	CAGCGACGAA	CCGGTCAACG	TGGACGCCAC	CCAGCCCACG	CTCCCAGGAG
9051	TGGCCGTCCC	AAGCGAAGCA	AGGCCGGCGT	AACGCCACGC	ACTACGAGGC
9101	AACCCCGAAA	TCCAACCGAA	GCCGCTACCC	GGGCTATCCC	CATGCCAACC
9151	GCCACGTAAAC	GGTGACGTAG	TGCCACGCC	TGCGTGGCAA	CCCCAGCCAA
9201	CCCACCCCGA	GCAAAAACCC	CGCGCCGCAA	CATGCGACAC	AGCCCCCACC
9251	AATGCTAGGA	TCGATCAACC	TTGAATCGAT	CTAAATTCAT	ATGAGCAGAG
9301	CGGGGAAGTC	GGGATGGGCG	GCGCTGGCAA	TCGGCGCCAT	GCTTGCAGCA
9351	GGGGGGGCAA	CAGCAGCCCC	GCAGAGCGCA	GGCGAACGCG	CCTACGCCGC
9401	GGTGGACCCG	TTCATCGGCA	CCGGCGGCGA	AGGGCATAAC	TATCCCAGCG
9451	CAACGGTGCC	GTTTCGGCATG	GTCCAGCTCA	GCCCAGGATC	GCGCATCCAG
9501	CCGCGGAAA	AGGCCTACGA	CTGGGCCGCC	GGCTACCGCT	ATGACGACAG
9551	CAGCATCGTC	GGCTTCTCGC	ATACCCACTT	CTCCGGCAGC	GGCCACTCCG
9601	ATCTGGGCGA	TGTGCTGGTG	ATGCCCTTCA	CCGGCGATCC	CGGGCTGGAA
9651	CGCGGCGACC	CGGAGAAGCC	GCGCAGCGGC	TACGCTCGC	GCTTCGACCA
9701	CAAGGACGAA	CAAGCGGAGC	CCGGCTACTA	CGCAGTGACC	CTGCAGGACT
9751	ACAAGGTCCG	CGCCGAGCTG	ACCGCCAGCG	CCCGTACCGG	CGTGCACCGT
9801	TATACGTATC	CGAAGGGCGA	GTCCGGCCAAG	CTGCTGCTCG	ACCTGCGCAC
9851	CAGCCTGTAC	GACTACCCCG	GCAAGATCCT	GTGGTCACGC	CTGCGCCTGC
9901	GCGACGACGG	CACGGTGACC	GGCTTCCGCG	AAACCCGCGG	CTGGGCCCCG
9951	GGCCGGCAGC	TGTACTTCGC	CATGCGTTTC	TCGCGCCAC	TCACCGGGCA
10001	CGCGCTGCAC	AACACCGAAA	CCGACATCGC	CTACAAGGGC	TTCCCAGCCG
10051	CGGGCCAGAA	CAACCCGGAG	CAGCGCCCGC	AGATCGAAGG	CCGCCAGCTG
10101	GTCGGACAGT	TCGATTTCCG	CAAACCTGAC	GCGCCGCTGG	TGGTACGCGT
10151	GGCGATCTCC	TCGGTGAGCG	AAGCCGGCGC	CATCGCCAAC	CTCGACGCCG
10201	AGGCCAGGGA	CCAGGACTTC	GACCGCATCC	GCGCCGACGC	GCGTACGCAA
10251	TGGCAGCAGG	CGTTGTCCGGT	GCTCGATATC	GACGCCCCGG	CGCATGACCG
10301	GCGCAGCGCC	TACACCGCGC	TGTACCACAG	CCTGCTCGGC	CCGACCCTGT
10351	TCATGGACGT	GGACGGCCAG	TACCGTGGTT	CGGACAACGC	CGTGCACCGC
10401	GCCGAGGGCT	ACACCAACTA	TTCGACCTTC	TCGCTGTGGG	ATACCTACCG
10451	CGCGCTGCAC	CCGCTGCTGA	CCCTGGTGCA	GCCGGAAAAG	CGCACCAGCG
10501	ACATGGTCAA	TTCGCTGCTC	GCCCACCAGC	ACAACAGCGC	CTACGGCATG
10551	CTGCCGGTAT	GGGCGTTCCA	TGGCCAGGAA	ACCTGGTGCA	TGATCGGTTA
10601	CCACGCGGTG	CCGGTGATCG	CCGATGCCTA	CGTCAAGGGC	ATCCGCGGTT
10651	TCGATGCCGA	CAAGGCGCTG	CAGTTCGATG	GCCGATTCTGA	AGGTGTTGGC
10701	GAAATCGCCA	CCCACCGCCA	GGTCATTCTG	CGCCACCCCG	TCGATACCCA
10751	CCGCACGGGT	GTGCTGCGGG	AAGCGCGCGG	CGTACTGCTG	GGCCACGCGG
10801	GTACCGTAGG	AACCGCCGAC	CAGGTTGATC	TTGTCCACGC	CCAGCGCAGC
10851	ACGCACCGCG	TCCAGGTCAC	CAATGGCCTC	GGTGGTGGTG	TAGAAGCGGG
10901	TGTCCGACAG	GTCCACCAGC	GCGGCGGCGC	AGCGCGTGGC	GAACTCGGGC
10951	ATCACCTCGG	GCGTGGCCGC	TGCGTTCTCG	TCGAACGCCA	GTTCCCTTACC
11001	GTCGCACTCC	ACGCAGCTGA	GCGGGTTGGA	TTTGCCGGTG	CCGCGCTAGG
11051	CCACCAGGAT	GATGTCGCGC	TTCTTGCGCA	CCTCGCGCAG	CGACTGGTTG
11101	ATGATGGCCG	CCACTTCCGT	GGCCGACTGG	CCCGGGCCAC	CGGCCAGGAA
11151	GAACACCGGG	TCCTGCTTGC	CCTCGCCTTC	GTTGGCGGTA	TCCAGCCAGG
11201	CGATGTTGAG	CCCGATCTTT	CGACCCCTCCG	GCGCATCGG	

### Priloga C Plazmidni vektor pUC19 (vir Human Molecular Genetics, 1999)

