

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jana PIŽMOHT

**ANALIZA STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE
SEDIMENTOV V PRIOBALNEM SLADKOVODNEM
IZVIRU IZOLA 32**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jana PIŽMOHT

**ANALIZA STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE SEDIMENTOV V
PRIOBALNEM SLADKOVODNEM IZVIRU IZOLA 32**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SEDIMENT MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE ANALYSIS
FROM SUBMARINE GROUNDWATER SPRING IZOLA 32**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2008

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

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avgušтина, za recenzenta pa prof. dr. Franca Viktorja Nekrepa.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avgušтин

Recenzent: prof. dr. Franc Viktor Nekrep

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd Avgušтин

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Franc Viktor NEKREP

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela,

Jana Pižmoht

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.68(262.3):579.26:579.8(043)=163.6
KG	mikrobna ekologija/vodna mikrobiologija/sedimenti/Izola/morski priobalni sladkovodni izvir/struktura mikrobne združbe/16S rDNK/PCR/DGGE/ sekvenciranje
AV	PIŽMOHT, Jana
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/NEKREP, Franc Viktor (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	ANALIZA STRUKTURE MIKROBNE ZDRUŽBE SEDIMENTOV V PRIOBALNEM SLADKOVODNEM IZVIRU IZOLA 32
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 60 str., 11 sl., 11 pregl., 3 pril., 53 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Preučevali smo pestrost in strukturo tistega dela mikrobne združbe iz sedimentov priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 v Jadranskem morju, ki smo ga lahko osamili in gojili na treh vrstah agariziranih gojišč. Po večkratnem precepljanju smo pridobili 24 izolatov - čistih kultur in jih mikro- in makro-morfološko opisali. Iz čistih kultur ter iz vzorcev sedimenta smo izolirali genomsko DNK. S širokospecifičnimi bakterijskimi začetnimi oligonukleotidi F338gc in 518R smo v verižni reakciji s polimerazo pomnožili ustrezne dele genov za 16S rRNK in jih analizirali z bioanalizatorjem Agilent 2100, ter jih razvrstili glede na dolžino pomnožkov. Interno strukturo pomnožkov smo analizirali z denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo in tako dobili DGGE profile posameznih izolatov in vzorcev sedimenta. Iz skupin, ki smo jih ustvarili glede na podatke opravljenih analiz, smo izbrali reprezentativne predstavnike, iz njihove genomske DNK pomnožili gene za 16S rRNK skoraj v celoti in te pomnožke sekvencirali. Uspešno smo pridobili 10 sekvenc, ki smo jih preliminarno taksonomsko uvrstili z orodjem Classifier v bazi podatkov RDP II.9, nato pa na njih in sekvencah bližnjih sorodnikov opravili še filogenetsko analizo. Večina izoliranih bakterij iz sedimentov izvira Izola 32 se je uvrstila v družino *Vibrionaceae*, še najbližje vrsti *Vibrio natrie*gens. Druge sekvence so bile slabše kakovosti, a smo jih kljub temu lahko uvrstili vsaj v višje taksonomske skupine. Tako smo izolirali še predstavnike družine *Rhodobacteraceae*, in dva po Gramu pozitivna člana filogenetskega debla *Firmicutes*, enega iz reda *Bacillales* in drugega iz reda *Clostridiales*. Po primerjavi z DGGE profili vzorcev sedimenta smo tudi ugotovili, da izolirani predstavniki heterotrofne deli mikrobne združbe po pričakovanju ne predstavljajo številčno pomembnejših bakterijskih populacij v sedimentih priobalnega izvira Izola 32. Ugotovili smo tudi, da uporabljene molekularne in fenotipske metode ne omogočajo, ne vsaka zase in ne skupaj, zanesljive uvrstitve izolatov v skladne taksonomske gruč.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.68(262.3):579.26:579.8(043)=163.6

CX microbial ecology/aquatic microbiology/sediments/Izola/submarine groundwater discharge
/microbial community structure/16S rDNA/PCR/DGGE/sequencing

AU PIŽMOHT, Jana

AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/NEKREP, Franc Viktor (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2008

TI SEDIMENT MICROBIAL COMMUNITY STRUCTURE ANALYSIS FROM
SUBMARINE GROUNDWATER SPRING IZOLA 32

DT Graduation thests (University studies)

NO X, 60 p., 11 fig., 11 tab., 3 ann., 53 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Diversity and structure of the cultivable part of the microbial community from submarine groundwater spring Izola 32 sediments of the Adriatic Sea were studied. Twenty four pure culture isolates were recovered from three different marine agar plate media and micro as well as macromorphologically described. DNA was isolated from pure cultures and directly from sediment samples and 16S rRNA gene segments were PCR-amplified using universally conserved bacterial primers F338gc and 518R. The PCR products were analyzed with Bioanalyzer Agilent 2100 and discriminated according to their length. The internal structure of the PCR products was analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and the DGGE profiles of pure cultures and sediment samples were obtained. Representative isolates were chosen from established groups of isolates, which were comprised on the basis of the retrieved data, their 16S rRNA genes were reamplified in almost entire length and sequenced. 10 sequences were recovered and preliminary taxonomically identified using the Classifier tool at the RDP II.9 database and than phylogenetically analyzed. The majority of the sequenced isolates belonged to the family *Vibrionaceae*, the closest match were the sequences from the species *Vibrio natriegens*. The remaining sequences were of lower quality, but could still be placed into higher taxons, however. We isolated members of the family *Rhodobacteraceae* and two Gram positive members of the phylum *Firmicutes*, one from the ordo *Bacillales* and the other from the ordo *Clostridiales*. The comparative analysis of the DGGE profiles from pure cultures and sediment samples showed, that the isolated members of the heterotrophic cultivable part of the sediment microbial community from the groundwater spring Izola 32 do not represent abundant or dominant bacterial populations from this ecosystem, as expected. We have also shown, that the used molecular and phenotypic methods, be it single or combined, do not make possible reliable placements of the isolates into coherent taxonomic groups.

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	XII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PRIOBALNI MORSKI SEDIMENTI	3
2.2 PODMORSKI SLADKOVODNI IZVIRI	4
2.3 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE MORSKIH SEDIMENTOV V TRŽAŠKEM ZALIVU	6
2.4 PRISTOPI K PREUČEVANJU MIKROBNIH ZDRUŽB IZ MORSKIH SEDIMENTOV	9
2.4.1 Nove metode za izolacijo in gojenje sedimentnih mikroorganizmov	10
2.4.2 Molekularne metode za preučevanje mikrobnih združb	12
2.4.2.1 Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV	16
3.2 IZOLACIJA IN GOJENJE SEDIMENTNIH MIKROORGANIZMOV	17
3.3.1 Makromorfološki opis	17
3.3.2 Barvanje po Gramu	17
3.4 IZOLACIJA DNK	18
3.4.1 Izolacija DNK iz sedimentnih vzorcev	18

3.4.2 Izolacija DNK iz čistih mikrobnih kultur	18
3.5 POMNOŽEVANJE 16S rDNK V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)	19
3.5.1 Pomnoževanje dela 16S rDNK za denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (DGGE)	19
3.5.1.1 Začetna oligonukleotida F338gc in 518R	19
3.5.1.2 Začetna oligonukleotida F968gc in 1401R	20
3.5.2 Pomnoževanje 16S rDNK za sekvenciranje	20
3.5.3 Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v diplomski nalogi	21
3.6 HORIZONTALNA AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA	21
3.7 ANALIZA DOLŽINE PCR POMNOŽKOV Z BIOANALIZATORJEM AGILENT 2100	22
3.8 DENATURACIJSKA GRADIENTNA GELSKA ELEKTROFOREZA (DGGE)	23
3.10 OBDELAVA 16S rDNK SEKVENC	24
3.11 RAZTOPINE IN PUFRI	24
3.11.1 Barvanje po Gramu	24
3.11.2 Izolacija DNK	25
3.11.3 Horizontalna agarozna gelska elektroforeza	26
3.11.4 DGGE	26
4 REZULTATI	27
4.1 MAKROMORFOLOŠKI IN MIKROMORFOLOŠKI OPIS	27
4.2 IZOLACIJA GENOMSKE DNK	29
4.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	31
4.3.1 Pomnoževanje dela 16S rDNK kot predstopnja denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE)	31
4.4 ANALIZA DOLŽINE PCR POMNOŽKOV Z BIOANALIZATORJEM AGILENT 2100	34
4.5 DENATURACIJSKA GRADIENTNA GELSKA ELEKTROFOREZA (DGGE)	36
4.6 POMNOŽEVANJE CELOTNE 16S rDNK ZA SEKVENCIRANJE	38
4.7 TAKSONOMSKA UVRSTITEV IZOLATOV GLEDE NA SEKVENCE 16S rDNK	39

4.7.1	<i>Vibrionaceae</i>	42
4.7.2	<i>Rhodobacteraceae</i>	45
4.7.3	<i>Firmicutes</i>	47
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	49
5.1	RAZPRAVA	49
5.2	SKLEPI	53
6	POVZETEK	55
7	VIRI	57
ZAHVALE		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Kemijska sestava vode iz podmorskega sladkovodnega izvira Izola 32, povprečne morske vode in kraške podtalnice (Faganeli in sod., 2005)	9
Preglednica 2: Program PCR	20
Preglednica 3: Program PCR	20
Preglednica 4: Program PCR	21
Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi	21
Preglednica 6: Opis celic in kolonij 24 domnevno čistih izolatov iz sedimentov sladkovodnega izvira Izola 32	28
Preglednica 7: Uspešnost izolacije genomske DNK iz vzorcev sedimenta priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 in iz izolatov	29
Preglednica 8: Razdelitev izolatov v skupine glede na analizo dolžine pomnožkov PCR z bioanalizatorjem Agilent 2100 in dolžina pomnožkov	34
Preglednica 9: Uspešnost pomnoževanja gena za 16S rRNK z različnimi pari začetnih oligonukleotidov	38
Preglednica 10: Uvrstitev sekvenc glede na bazo podatkov RDP II.9 (Cole in sod., 2005) z orodjem Classifier	40
Preglednica 11: Razvrstitev sekvenc po posameznih skupinah	43

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Lega Tržaškega zaliva (Alič in Kladnik, 1999)	6
Slika 2: Oblike morskega dna pred Rtičem Ronek na koncu Strunjanskega polotoka (Žumer, 2004)	7
Slika 3: Elektroforetska ločitev mikrobne genomske DNK izolirane iz vzorcev sedimenta priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 in iz izolatov	30
Slika 4: Elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja 16S rDNK, izolirane iz vzorcev sedimenta priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 in iz izolatov, s PCR in začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R	32
Slika 5: Elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja 16S rDNK I ₃₂ 1-9 in I ₃₂ 1-10 s PCR in začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R	33
Slika 6: Elektroferogram pomnožkov izolatov iz priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32	35
Slika 7: Ločitev pomnožkov izolatov iz priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 z denuracijsko gradientno gelsko elektroforezo	37
Slika 8: Filogenetsko drevo za 10 pridobljenih sekvenc (neobtežena metoda parnih skupin z aritmetično sredino – UPGMA)	41
Slika 9: Uvrstitev izolatov I ₃₂ 1-6, I ₃₂ 1-7, I ₃₂ 1-8, I ₃₂ 1-9, I ₃₂ 3-2 in I ₃₂ 3-3 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa) družine <i>Vibrionaceae</i> , narejeno s programskim paketom MEGA 4	44
Slika 10: Uvrstitev izolatov I ₃₂ 1-2 in I ₃₂ 2-9 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa) reda <i>Rhodobacteraceae</i> , narejeno s programskim paketom MEGA 4	46
Slika 11: Uvrstitev izolatov I ₃₂ 1-12 in I ₃₂ 2-5 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa) debla <i>Firmicutes</i> , narejeno s programskim paketom MEGA 4	48

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Sekvence izolatov iz sedimentov podvodnega izvira Izola 32 v Fasta formatu v surovi in popravljeni obliki. Sekvencam sledijo rezultati iskanja najbolj podobnih sekvenc v bazah podatkov NCBI in EBI z dne 5. 7. 2007
- Priloga A1:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A2:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A3:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A4:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A5:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A6:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A7:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A8:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A9:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga A10:** Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI
- Priloga B:** Kemijska sestava prahu za pripravo 1000 ml trdnega gojišča marine agar (MA)

Priloga C: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskih dreves

Priloga C1: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa družine *Vibrionaceae*

Priloga C2: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa družine *Rhodobacteraceae*

Priloga C3: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa debla *Firmicutes*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	akrilamid
APS	amonijev persulfat
BA	bisakrilamid
bp	bazni par
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid
DGGE	denaturacijska gradientna gelska elektroforeza (<i>angl.</i> denaturing gradient gel electrophoresis)
DNK	deoksiribonukleinska kislina (<i>angl.</i> deoxyribonucleic acid, DNA)
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (<i>angl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)
EtBr	etidijev bromid
<i>Firmicutes</i>	Imajo po Gramu pozitivno celično steno in večinoma tvorijo endospore
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija
FKI	fenol-kloroform-izoamilalkohol
MA	morski agar (<i>angl.</i> marine agar)
Magg	morski agar z dodanim gelanskim gumijem
MPN	metoda ugotavljanja najverjetnejšega števila mikroorganizmov (<i>angl.</i> most probable number)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	verižna reakcija s polimerazo (<i>angl.</i> polymerase chain reaction)
rDNK	ribosomska DNK (<i>angl.</i> ribosomal DNA, rDNA)
RDP II.9	Ribosomal Database Project II, Release 9
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (<i>angl.</i> restriction fragment length polymorfism)
<i>Rhodobacteraceae</i>	Uvrščajo se med α -proteobakterije in se barvajo po Gramu negativno. Ta družina je fenotipsko, presnovno in ekološko zelo raznolika.
RNK	ribonukleinska kislina (<i>angl.</i> ribonucleic acid, RNA)
rRNK	ribosomska RNK (<i>angl.</i> ribosomal RNA, rRNA)

SDS	natrijev dodecil sulfat
SSW	sterilizirana morska voda (<i>angl.</i> sterilized sea water)
TBE	Tris-borat-EDTA
TGGE	temperaturna gradientna gelska elektroforeza
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin
Tris	Tris(hidroksimetil)-aminometan
UPGMA	netehtana aritmetična sredina parnih skupin (<i>angl.</i> unweighted pair-group method, arithmetic mean)
<i>Vibrionaceae</i>	Sodijo med γ -proteobakterije in so po Gramu negativne gibljive palčke. So kemoorganotrofi z oksidativno in fermentativno presnovo. Imajo polarni flagel in potrebujejo 2-3 % NaCl

1 UVOD

Podmorski sladkovodni izvir predstavlja pomembno pot transporta materiala v morsko okolje. To je pomembno za geokemična kroženja v morju in lahko vodi do onesnaženja priobalne cone. Medtem ko so doprinosi večjih rek dobro analizirani in je mogoče precej natančno oceniti vnos sladke vode in onesnaževal v ocean, pa je ocena vpliva podmorskih pritokov na priobalno morsko okolje veliko težja, saj za to ni preprostih metod.

Izvir podtalne sladke vode v priobalno morsko okolje ima lahko za okolje daljnosežne posledice, saj je podtalna voda na mnogih področjih onesnažena z različnimi snovmi, kot so hranila, težke kovine, radionuklidi in organske snovi. Ker do podmorskih izvirov podtalne vode prihaja v skoraj vseh priobalnih območjih, so ta območja pogosto podvržena poslabšanju razmer v okolju. Transport hranil v priobalne vode namreč lahko sproži cvetenje alg, ki ima v nekaterih primerih tudi negativen vpliv na ekonomijo priobalnih območij (Burnett in sod., 2006).

Raziskave o podmorskih sladkovodnih izviroh v svetu se ukvarjajo predvsem z geokemičnimi lastnostmi podtalne vode in vplivom prisotnih snovi na okolje. V slovenskem delu Jadranskega morja je bilo pred nedavnim opisanih osem priobalnih sladkovodnih izvirov v okolici Izole. Od teh je najboljše preučen izvir Izola 32, opisane so tudi njegove geokemične lastnosti (Žumer, 2004).

Študije morskih sedimentnih ekosistemov so v Jadranskem morju večinoma usmerjene k spoznavanju flore in favne ali preučevanju geokemijskih in geomikrobnih procesov ter vpliva mikrobne presnovne aktivnosti na makrobioto. Z mikrobioto v teh ekosistemih pa se šele spoznavamo. Sedimenti ob podmorskih sladkovodnih izviroh so tako v mikrobiološkem pogledu zanimiv ekosistem, ki pa ga je potrebno šele preučiti.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

Pri našem delu smo se osredotočili na mikrobno združbo v sedimentih ob izviru. Pri tem smo z molekularnimi in s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami preučevali strukturo mikrobne združbe iz sedimentnih vzorcev jadranskega priobalnega sladkovodnega izvira

Izola 32. S tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami lahko namreč iz okoljskih vzorcev vzgojimo le zelo majhen del mikroorganizmov in na ta način ne moremo oceniti pestrosti združbe. S kombinacijo obeh pristopov smo tako poskušali dobiti preliminarne vpogled v dejansko strukturo mikrobne združbe.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PRIOBALNI MORSKI SEDIMENTI

Morski sedimenti so depoziti netopnega materiala, primarno kamnin in delcev zemlje, ki se iz kopnega v morje prenašajo z vetrom, ledom in rekami, pa tudi ostanki morskih organizmov, produkti podmorskih vulkanov in iz morske vode precipitirane snovi, ki se akumulirajo na morskem dnu. Prekrivajo približno 70 % zemljine površine (Llobet-Brosa in sod., 1998) in so mesta z najbolj intenzivnimi in raznolikimi procesi transformacije organskih in anorganskih substratov v morju. Priobalna območja so tudi visoko produktivni ekosistemi, ki imajo pomembno vlogo v globalnem kroženju ogljika in dušika.

Akumulacija organskega detrita v morskih sedimentih, predvsem v priobalnih območjih, v območjih dvigovanja vode (ang. upwelling) ali v nekaterih globokomorskih kotanjah omogoča visoko stopnjo respiratorne porabe kisika s strani mikroorganizmov in višjih organizmov. Taki sedimenti so pogosto anoksični pod le nekaj milimetrov debelo oksično plastjo. Ko kisika zmanjka, se v sedimentu vzpostavi stabilen vertikalni gradient, v katerem se, običajno glede na padajoč redoks potencial, porabljajo različni elektronski prejemniki. Od površine sedimenta navzdol si sledijo nitrat, nitrit, mangan ali železovi oksidi, sulfat in ogljik. Gradienti so funkcija vnosa organske snovi, presnovnih sposobnosti mikroorganizmov in geokemizma okolja. Če predpostavimo, da je mešanje minimalno, bodo gradienti nastali kadarkoli bo produkcija ali poraba kakega produkta ali hranila presegla stopnjo difuzije tega produkta ali reaktanta (Nealson, 1997).

Oksične, prehodne in anoksične cone v sedimentih dajejo zavetje raznolikim mikrobnim združbam. Aktivnost bakterij v sedimentu pomembno vpliva na globalno kroženje elementov in je skozi geološka obdobja vodila tudi do nastanka velikih mineralnih depozitov. Zaradi bakterijske aktivnosti v sedimentih se spreminja sestava organske snovi v njih in počasi izginja. Bakterije najprej razgradijo lažje razgradljive snovi, težje razgradljive snovi pa se kopičijo v globljih plasteh sedimenta (Surajit Das in sod., 2006). Z globino se število mikrobnih celic v sedimentu manjša in upade do nekega konstantnega števila (Braker in sod., 2001).

Na mikrobne procese v sedimentu poleg odlaganja organskih substratov in difuzije topljencev vplivajo tudi transportni procesi. Ti so še posebej pomembni v plitkih priobalnih območjih z močnimi vodnimi tokovi, v hidrotermalnih izviri in v izviri podtalne vode. Sestavni del sedimenta so tudi minerali (gline, karbonati, silikati, kovinski oksidi), ki so lahko reaktanti in/ali produkti v mikrobni presnovi in tako strukturno in funkcionalno vplivajo na mikrobno ekologijo in presnovo (Nealson, 1997).

Sestava mikrobne združbe je povezana s plastmi v sedimentu, ki imajo značilne litološke in geokemične lastnosti. Wilms in Köpke (2006) sta v svojih raziskavah ugotovila, da na bakterijsko združbo najbolj vpliva dostopnost in kvaliteta vira ogljika, kar pomeni, da je za mikrobno združbo v sedimentu dajalec elektronov bolj pomemben od prejemnika elektronov, saj je v sedimentu običajno na razpolago dovolj različnih prejemnikov elektronov.

2.2 PODMORSKI SLADKOVODNI IZVIRI

Podmorski sladkovodni izviri so bili dolgo časa le malo preučevani, saj jih je bilo težko odkriti in preučiti njihove lastnosti. Šele sedaj se čedalje bolj zavedamo, da so podmorski sladkovodni izviri več kot samo zanimivost, so občutljiva okolja, kjer se mešata podtalna in morska voda. Poleg sladke vode takšni izviri v morsko okolje prinašajo tudi onesnaževala iz različnih antropogenih virov na kopnem. Osnovno gonilo sladkovodnega podmorskega izvira je količina padavin, ki pronicajo v tla, in je povezana s stopnjo evapotranspiracije in z geologijo površja (UNESCO, 2004). Razumevanje tega pojava je pomembno ne samo v smislu kroženja vode ali potencialnega vira vode, ampak tudi za upravljanje priobalnega okolja, kjer lahko nezaželeni onesnaževala v podtalnici prehajajo v priobalno morsko vodo (Taniguchi, 2002).

Podmorski izviri podtalne vode se pojavljajo povsod, kjer je območje podtalne vode povezano z morjem preko prepustnih sedimentov. Slana voda običajno vdre pod območje sladke vode (Johannes, 1980). V različnih priobalnih okoljih podmorski sladkovodni izviri zavzemajo različne oblike. Lahko so precej razširjeni in difundirajo skozi peščeno morsko dno, sladka voda pa počasi pronica navzgor z majhno hitrostjo na obsežnem območju. Ti

izviri pogosto ostanejo neopaženi. Izviri pa so lahko tudi usmerjeni in imajo žarišče na enem mestu, kjer voda pod pritiskom prihaja na površje. Takšni sladkovodni izviri so prisotni predvsem v kraških okoljih. V okoljih, kjer kanaliziran tok v globini pronica skozi plast enotnega sedimenta, je sladkovodni podmorski izvir lahko tudi kombinacija obeh opisanih. Čista sladka voda je v tem primeru prisotna samo na mestu, kjer podtalnica prihaja na površje (UNESCO, 2004). Pronicanje podtalnice je praviloma neenakomerno, razpršeno, časovno variabilno in lahko vključuje več vodnih zbiralnikov (Burnett in sod., 2006).

Podmorski izviri so pomembne komponente mnogih priobalnih območij. Podtalnica, ki prehaja skozi te sisteme, se meša z morsko vodo, na njeno kemično sestavo pa vplivajo tudi reakcije v sedimentu (Moore, 1999). Zato je v podtalnici prisotna višja koncentracija raztopljenih snovi kot v kopenskih površinskih vodah in podmorski sladkovodni izvir veliko prispeva k pretoku raztopljenih delcev, ki so lahko v priobalnih vodah pomemben vir hranil. Problemi pa nastanejo, ko se preko podtalnice v morje prenašajo različni onesnaževala in hranila, predvsem dušik. Zaradi tega lahko pride do eutrofikacije, predvsem npr. v zaprtih zalivih. (UNESCO, 2004). Prehod snovi preko interfeze sediment/voda v morskih okoljih je zelo pomemben za biološko produktivnost, pomemben pa je lahko tudi za geološke mineralizacijske procese (Simmons, 1992).

Johannes (1980) je bil eden prvih, ki je raziskoval podmorske sladkovodne izvire kot možen vir hranil v priobalnih območjih. Ker je podtalnica pogosto obogatena z naravnimi in antropogenimi hranili, je podmorski sladkovodni izvir lahko ekološko pomemben tudi, ko so pretoki glede na vstop površinske vode nizki. V priobalnih vodah je omejujoč dejavnik dušik in je prisoten le v zelo nizkih koncentracijah. V podmorskem sladkovodnem izviru pa je lahko koncentracija nitrata 2 do 3-krat večja kot v morski vodi in je lahko pomemben vir nitrata v priobalnih vodah. Klorid se v podtalnici pojavlja le v majhnih koncentracijah. Bikarbonat je v podtalni vodi običajno najbolj razširjen negativni ion, medtem ko se v morski vodi pojavlja v relativno nizkih koncentracijah. Visoka raven amonija in redukcijska aktivnost sulfata vodita do povišanja pH, kar spremlja spremenjena raven bikarbonata.

Slanost intersticijske vode v priobalnih sedimentih je pogosto nižja od povprečne slanosti morske vode zaradi prisotnosti podtalne sladke vode. Ker podtalnica lahko vsebuje visoke koncentracije nitrata v primerjavi z morskno vodo, lahko ob mešanju obeh tipov vode pričakujemo negativno korelacijo med količino nitrata in slanostjo. To pa vpliva na razporeditev organizmov v vodni združbi. Bolj bujna rast nekaterih organizmov ob zmanjšani slanosti je lahko posledica tako povečane količine hranil kot tudi zmanjšanega osmotskega stresa. Podmorski sladkovodni izvir tako vpliva na produktivnost, biomaso, sestavo in razporejenost združb (Johannes, 1980).

2.3 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE MORSKIH SEDIMENTOV V TRŽAŠKEM ZALIVU

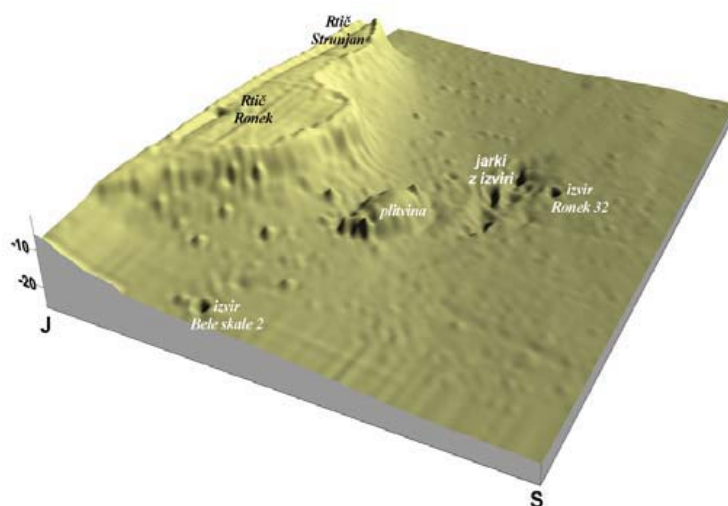


Slika 1: Lega Tržaškega zaliva (Alič in Kladnik, 1999)

Tržaški zaliv je plitvo robno morje, skrajni severni del Jadrana, s površino okrog 570 km². Na jugovzhodu meji na Slovenijo in Hrvaško, na severu in na zahodu pa na Italijo. Tržaški zaliv je od Jadranskega morja delno ločen s plitvino, ki leži na črti Savudrija – Gradež s širino približno 21 km. Ker je v njem razmeroma malo vode, je izjemno občutljiv na

ekološke spremembe. Povprečna globina morja v Tržaškem zalivu je le 16,4 m. Manj kot polovica zaliva je globoka okrog 20 m, v manj kot sedmini zaliva so globine od 10 do 15 m in več kot petina zaliva je plitvejša od 10 m. Le malo kje je Tržaški zaliv globlji od 25 m. Najgloblja točka je 37,5 m, in sicer blizu obale pred rtom Madona pri Piranu.

V podvodnem površju ni večjih izstopajočih morfoloških oblik, izjema so že omenjena kotanja z največjo globino pri Piranu in v zadnjem času odkriti podvodni izviri pri Izoli. Osrednji del morskega dna v Tržaškem zalivu (98 %) prekrivajo večinoma drobno zrnati sedimenti, ki se med seboj razlikujejo po velikosti delcev. Sedimenti bliže obal so praviloma finejši. Ob apneniški obali je delež peska v sedimentnem dnu priobalne podvodne terase večji kot ob flišni obali (Orožen Adamič, 2002).



Slika 2: Oblike morskega dna pred Rtičem Ronek na koncu Strunjanskega polotoka (Žumer, 2004).

Sladka voda vstopa v Tržaški zaliv z različnimi rekami, na jugovzhodu sta to Dragonja in Rižana, na severozahodu pa Soča in Timav. Poleg rek vir sladke vode predstavljajo tudi podmorski sladkovodni izviri. Slanost morja v Tržaškem zalivu se giblje med 33 in 38‰, temperature vode pri dnu pa med 8 in 22 °C (Hines in sod., 1997). Zaradi pritoka velikih rek (Pad, Soča, Timav) je slanost v Severnem Jadranu manjša od slanosti srednjega in Južnega Jadrana (Russo, 1996). V poznem poletju zaradi gradienta gostote in velike porabe kisika pri dnu pogosto pride do nastanka anoksičnih con (Hines in sod., 1997).

Poznavanje morskih sedimentnih ekosistemov slovenskega prostora z mikrobno taksonomskega vidika je pomanjkljivo. Na morskih sedimentih Tržaškega zaliva je bilo sicer opravljeno več raziskav (Herndl in sod., 1989; Hines in sod., 1997; Ogrinc in sod., 2003), vendar so se raziskovalci osredotočili na preučevanje geokemijskih parametrov, biogeokemijskih procesov ter ugotavljanje mikrobne presnovne aktivnosti v sedimentih in vpliva teh aktivnosti na bentoško floro in favno. Pestrost aerobnih kemotrofnih bakterij, izoliranih iz površja slojev morskih sedimentov, je glede na podobnosti v profilu dolžin restrikcijskih fragmentov ribosomskih genov za 16S rRNK v svoji diplomski nalogi opisala N. Klemenčič (2006).

Hines in sod. (1997) so spremljali razgradnjo organske snovi v površinskih sedimentih Tržaškega zaliva, kjer pozno poleti lahko pride do pomanjkanja kisika. Lokalno pomanjkanje kisika vpliva na biogeokemijo sedimentov, na način razpada organske snovi in na bentoško favno. V hipoksičnih, predvsem pa v anoksičnih razmerah sta v sedimentih pomembna prejemnika elektronov Fe^{3+} in Mn^{4+} , zaradi visoke koncentracije pa je še posebej pomemben SO_4^{2-} . V odsotnosti kisika, ki edini lahko reoksidira Fe^{2+} in Mn^{2+} , postane poglavitni terminalni prejemnik elektronov SO_4^{2-} . Ta se reducira do elementarnega žvepla ali do sulfida, ki se izloči v okolje. Bentoška makrofavna je tako poleg neugodnih vplivov pomanjkanja kisika izpostavljena še toksičnim vplivom zaradi kopičenja sulfida.

Podmorske sladkovodne izvire v okolici Izole so doslej opisali le v dveh raziskavah (Žumer, 2004; Faganeli in sod., 2005). Faganeli je s sodelavci v svoji raziskavi opisal geokemijske značilnosti podmorskega izvira Izola 32. Vzorce vode so odvzeli novembra 2003 in v njih določili vsebnost različnih kemičnih elementov. Koncentracije topljencev v izviru so primerjali s sestavo podtalnice in morske vode. Slanost vode v izviru je 5 ‰, saj pride do redčenja in mešanja morske in sladke vode. V **Preglednici 1** je prikazana kemijska sestava vode iz izvira, podtalnice in morske vode.

Preglednica 1: Kemijska sestava vode iz podmorskega sladkovodnega izvira Izola 32, povprečne morske vode in kraške podtalnice (Faganeli in sod., 2005)

Topljenci	Izvir Izola 32	Morska voda	Podtalnica
Na (mM)	73,7	468,03	0,21
Mg (mM)	3,14	53,08	0,19
K (mM)	1,96	10,21	0,02
Ca (mM)	8,12	10,25	2,23
Sr (mM)	0,11	0,09	0,003
B (mM)	0,12	0,27	/
Si (mM)	0,67	0,007	0,15
Al (μM)	0,33	0,02	0,11
Ba (μM)	0,487	0,073	0,385
Mn (μM)	0,404	0,004	0,013
Fe (μM)	0,351	0,036	0,08
Zn (μM)	0,05	0,002	0,04
Li (μM)	26,3	26,1	72,5
DIC (mM)	4,03	2,33	4,33
$\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ (‰)	-3,5	-0,9	-12,0
NH_4^+ (mM)	0,06	0,001	/
PO_4^{3-} (μM)	1,4	0,1	/
pH	7,09	8,15	7,70
Slanost (‰)	5	35	

Legenda: DIC – raztopljen inorganski ogljik (ang. dissolved organic carbon); $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ – delež ^{13}C v DIC

Rezultati kažejo, da so meteorne vode, ki izvirajo v podmorskem sladkovodnem izviru Izola 32, geokemijsko podobne kraški podtalnici, zmešani s približno 15 % morske vode.

Žumer (2004) je v svoji raziskavi opisal osem doslej odkritih priobalnih sladkovodnih izvirov v okolici Izole. Kotanji izvirov Izola 32 in Ronek 32 po velikosti izstopata in sta tudi podrobneje opisani (izvir Izola 32 je opisan v poglavju 3.1).

2.4 PRISTOPI K PREUČEVANJU MIKROBNIH ZDRUŽB IZ MORSKIH

SEDIMENTOV

Večinoma se študije, v katerih želimo spoznati kakšni mikroorganizmi naseljujejo nek ekosistem, pričnejo z izolacijo in gojenjem čistih kultur. Žal lahko s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami vzgojimo iz okoljskih vzorcev le zelo majhen del mikroorganizmov, od 0,001 do 15 % (0,25 % iz sedimentov) (Amman in sod., 1995). Tako večina tistega, kar je do sedaj znanega o sedimentnih mikroorganizmih izhaja iz rezultatov

molekularno bioloških študij, ki temeljijo na izolaciji, pomnoževanju in analizi mikrobne DNK brez gojenja samih mikroorganizmov in posledično brez spoznanj o njihovi morfologiji, fiziologiji in genetiki, oziroma iz preučevanj tistega manjšinskega deleža mikrobnih združb, ki ga lahko v *in vitro* laboratorijskih razmerah gojimo. Preučevanja izoliranih mikroorganizmov ostajajo pomembna, saj lahko ocenimo ekološko vlogo mikroorganizmov v naravnih okoljih le, če jih podrobno spoznamo.

Z uporabo molekularno bioloških metod so znanstveniki odkrili številne edinstvene in prej nepoznane mikroorganizme v vzorcih različnih okolij. Podrobnejše razumevanje fiziologije teh organizmov in posledično okoljskih procesov pri katerih sodelujejo pa kot rečeno zahteva njihovo izolacijo in uspešno gojenje. Gojenje mikroorganizmov je pogosto zahtevno, vzame veliko časa in, kar je najpomembnejše, ne omogoča spoznavanja celotne mikrobne združbe nekega ekosistema in morda tudi ne najpomembnejših predstavnikov takšne združbe. Dobršen del mikrobnih celic, prisotnih v vzorcih, odvzetih iz naravnih ekosistemov, je vidnih pod mikroskopom in živih, vendar na trdnih gojiščih običajno ne rastejo in ne tvorijo vidnih kolonij. Ta fenomen je posledica neprimernih razmer v večini gojišč (npr. previsoke koncentracije hranil ali pomanjkanje specifičnih hranil, nujno potrebnih za rast). Večina novejših gojitvenih metod poskuša posnemati razmere v naravnem okolju. To vodi do uporabe zelo razredčenih gojišč, ki podpirajo le minimalno celično rast, rezultat pa so precej daljši inkubacijski časi, a je uspešnost pri izolaciji in gojenju mikroorganizmov, ki sicer ne bi zrasli, bistveno večja (Oremland in sod., 2005).

2.4.1 Nove metode za izolacijo in gojenje sedimentnih mikroorganizmov

Köpke in sod. (2005) so za gojenje in izolacijo čim večjega števila mikroorganizmov iz priobalnih sedimentov uporabili različna gojišča in obogatitvene strategije, ki so bile selektivne za specifične skupine bakterij. Za kvantitativno oceno posameznih delov in celotne mikrobne združbe so uporabili definirano gojišče z različnimi viri ogljika v kombinaciji z različnimi prejemniki elektronov in metodo MPN (ang. most probable number). Za obogatitev in izolacijo mikroorganizmov so uporabili gojišča, v katerih so vzpostavili substratni gradient, in se na ta način izognili t. i. substratnemu šoku. Iz površja sedimenta so tako uspeli izolirati bistveno večje število različnih fizioloških skupin

mikroorganizmov kot z običajnimi gojišči. Izboljšano gojišče za MPN v kombinaciji z obogatitvenimi kulturami v gradientu je tako omogočilo izolacijo zelo raznolikih mikroorganizmov.

Mikroorganizme, ki jih do sedaj nismo uspeli izolirati in gojiti, bi morda lahko gojili v *in vitro* razmerah, če bi jim zagotovili kemične snovi iz njihovega naravnega okolja. To hipotezo so preizkusili Kaeberlein in sod. (2002). Da bi omogočili dostop do teh komponent, so pripravili t. i. difuzijske komore. Le-te sestavlja tesnilo iz nerjavečega jekla, na katero je z vsake strani prilepljena polikarbonatna membrana, notranjost pa je napolnjena s testnimi mikroorganizmi v poltrdnem agarju. Difuzijske komore so po nacepljanju inkubirali v akvariju, ki je ponazarjal naravne razmere, v katerih so preučevani mikroorganizmi živeli. Tako so omogočili izmenjavo kemičnih snovi med komoro in okoljem, preprečili pa so uhajanje mikrobnih celic. Mikroorganizme, ki so rasli v difuzijski komori, so poskušali nato izolirati in gojiti v čistih kulturah na standardnih gojiščih, a večinoma neuspešno. Mikroorganizmi očitno za rast potrebujejo tudi specifične signale iz okolja in zato ne zrastejo v čisti kulturi na umetnem gojišču *in vitro*. Z uporabo difuzijske komore se lahko takšnim omejitvam izognemo.

Zengler in sod. (2002) so opisali zelo učinkovito metodo (ang. high throughput) gojenja, ki temelji na enkapsulaciji celic, ta pa omogoči celicam rast v razmerah, ki so čim bolj podobne okolju. Pripravili so mešanico agaroznega matriksa in primerno redčenih vzorcev, ki so vsebovali cca 10^7 celic/ml. S posebnim aparatom so nato ustvarili mikrokapljice, v katere so bile ujete mikrobne celice. Pore v mikrokapljicah omogočajo izmenjavo različnih molekul, preprečujejo pa izhod mikroorganizmov. Mikrokapljice so več tednov inkubirali v sterilnih kromatografskih kolonah, ki so vsebovale različna oligotrofna gojišča. Za gojišča so uporabili s filtracijo sterilizirano morsko vodo (SSW), SSW z dodanimi anorganskimi minerali, SSW z dodanimi aminokislinami ali s SSW razredčen morski agar. Na začetku in na koncu kromatografskih kolon so bili nameščeni filtri, ki so na vrhu preprečevali kontaminacijo s prosto živečimi celicami, spodaj pa so omogočali izpiranje prosto živečih celic. S pretočnim citometrom so nato ločili mikrokapljice, ki so vsebovale kolonije, prazne mikrokapljice in prosto živeče celice. Mikrokapljice z mikrokolonijami so nacepili na mikrotitrne plošče z organsko bogatim gojiščem. V verižni reakciji s

polimerazo (PCR) so nato pomnožili 16S rDNK iz okoljskih vzorcev, mikrokolonij in kultur. Sledilo je kloniranje in sekvenciranje 50 naključno izbranih klonov. Na razredčenem morskem agarju so tako identificirali le bakterije iz rodov *Vibrio*, *Marinobacter* in *Cytophaga*, na SSW gojišču pa je zraslo veliko različnih mikroorganizmov. S to metodo so omogočili rast in so uspešno izolirali precejšnje število dotlej še nikoli opisanih mikrobni vrst.

Connon in Giovannoni (2002) sta za izolacijo in gojenje še neznanih mikrobni vrst iz bakterijskega planktona razvila učinkovito metodo, ki temelji na redčenju vcepka v majhnem volumnu oligotrofnega gojišča. Za gojišča so uporabili prefiltrirano in avtoklavirano morsko vodo. Za vzpostavitev bikarbonatnega puferskega sistema so jo prepihovali s sterilnim CO₂, nato pa še s sterilnim zrakom. Vzorce so redčili s pripravljeno morsko vodo in z njimi cepili gojišča v mikrotitrskih ploščah. Rast so zaznavali s celičnimi mrežami. Metoda omogoča istočasno gojenje velikega števila mikroorganizmov in učinkovit način pregleda rasti. Izolate so identificirali z analizo restrikcijskih polimorfizmov fragmentov (RFLP) in s sekvenciranjem. Identificirali so 47 od 56 različnih izolatov, ki so jih uvrstili med α , β in γ proteobakterije in v filogenetsko deblo *Bacteroidetes*. Rast v pripravljeni morski vodi so primerjali tudi z rastjo na obogatenih trdnih gojiščih. V primerjavi z gojenjem na agarjskih ploščah bogatih s hranili so dosegli bistveno boljše rezultate. Prednost te metode so tudi krajši inkubacijski časi in večja možnost odkrivanja manjšega števila celic.

Wilms in Köpke sta ugotovila, da je v priobalnih sedimentih mikrobna aktivnost največja v zgornjih 10 do 40 cm. Iz zgornjih slojev sedimenta so bile najpogostejše izolirane in opisane proteobakterije, v spodnjih slojih pa so med izolati prevladoval bakterije iz debla *Bacteroidetes*.

2.4.2 Molekularne metode za preučevanje mikrobni združb

V zadnjih dveh desetletjih so mikrobiologi za ugotavljanje mikrobne pestrosti v naravnih ekosistemih začeli uporabljati različne molekularne metode, kot so pomnoževanje specifičnih delov mikrobne genoma z verižno reakcijo s polimerazo (PCR),

sekvenciranje pomnoženih genov, fluorescentno *in situ* hibridizacijo (FISH), denaturacijsko ali temperaturno gradientno gelsko elektroforezo (DGGE, TGGE), analizo polimorfizma dolžin končnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) in druge (Keller in Zengler, 2004). Večina metod temelji na preučevanju genov ribosomske RNK, predvsem manjše ribosomske podenote oziroma 16S rRNK (Rappe in Giovannoni, 2003).

Uporaba molekularnih tehnik v okoljskih raziskavah temelji in je odvisna od uspešnosti izolacije nukleinskih kislin iz vseh ali večine celic, ki sestavljajo mikrobno združbo. Ker izolacija DNK iz vseh mikrobnih celic v vzorcu zaradi razlik v celičnih stenah ne more biti enako uspešna, lahko pri analizah strukture mikrobne združbe določene skupine podcenimo ali precenimo. Problematični so lahko različni koraki izolacije: nepopolna celična liza, absorpcija DNK na delce sedimenta, sočasna ekstrakcija encimskih inhibitorjev in tudi izgube, degradacija ter poškodbe DNK. Vse metode izolacije DNK niso enako učinkovite, na učinkovitost izolacije pa vpliva tudi tip vzorca. Miller in sod. (1999) so primerjali in statistično ovrednotili učinkovitost 9 različnih načinov ekstrakcije DNK iz različnih vrst tal in sedimentov. Za razbitje celic so uporabili različne kemične snovi, fizikalne metode in lizocim, metode pa so med seboj primerjali glede na velikost in količino izolirane DNK. Kot najboljša se je izkazala metoda homogenizacije vzorca v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS) z naknadno ekstrakcijo mikrobne DNK s kloroformom ali fenolom. Ovrednotili so tudi 4 različne metode čiščenja DNK, kar je zelo pomembno, saj lahko prisotnost določenih snovi ovira nadaljnje analize. Pomembno je tudi, da med čiščenjem čim bolj zmanjšamo izgube DNK. Kot najprimernejša se je izkazala metoda s separacijsko kolono, ki vsebuje Sephadex G-200.

V verižni reakciji s polimerazo (PCR) lahko dele mikrobnega genoma močno namnožimo in tako pridobimo velike količine specifičnih genov za kloniranje, sekvenciranje ali mutagenezo (Madigan in sod., 2003). S PCR v mikrobno ekoloških in taksonomskih raziskavah najpogosteje pomnožujemo gene za rRNK, običajno gre za 16S rRNK. Če preučujemo le določeno skupino mikroorganizmov, nam lahko celo bolj koristi pomnoževanje za to skupino značilnih evolucijsko ohranjenih genov, kot so npr. za denitrifikatorje specifični geni *nir* (Braker, 2001; Santoro in sod., 2006) ali za reducente sulfata specifični geni *dsr* (Geets in sod., 2006). Tehnika PCR je močno skrajšala čas,

potreben za analizo genov, vendar pa ima tudi nekatere pomanjkljivosti. Pri pomnoževanju genov iz mešanih kultur lahko pride do nastanka himernih sekvenc, ki jih sestavljajo sekvence različnih vrst. Manj pogoste organizme v vzorcu bogatega in kompleksnega ekosistema le težko zaznamo. Zaradi uporabe specifičnih začetnih oligonukleotidov lahko pride do selektivnega pomnoževanja, zato lahko določene skupine podcenimo ali precenimo (Amann in sod., 1995).

Metagenomske študije DNK celotne mikrobne združbe prav tako predstavljajo novo dimenzijo okoljske mikrobiologije. Takšne študije vodijo do skoraj popolne genomske in presnovne rekonstrukcije zaenkrat le v primerih relativno preprostih mikrobni združb in vsebujejo informacijo o pomembnih vidikih mikrobne biogeokemije, bioremediacije in simbioze (Podar in sod., 2007). Po kloniranju okoljske DNK v primeren vektor lahko pride do izražanja genov, kar omogoča identifikacijo novih genov ali identifikacijo funkcije neznanih genov v sekvenciranih genomih z določenim zaporedjem (Handelsman, 2004).

2.4.2.1 Denaturacijska gradientna gelska elektroforeza

Z denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (DGGE) lahko direktno opišemo sestavo kompleksnih mikrobni združb. Tehnika temelji na elektroforezi v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnoženih delov 16S rDNK v poliakrilamidnih gelih z linearno naraščajočim gradientom denaturanta. Z DGGE lahko ločimo DNK pomnožke enake dolžine, vendar z različno bazno sestavo. Ko pride do denaturacije, se potovanje molekule v gelu upočasni ali ustavi, saj je mobilnost denaturiranih molekul DNK v primerjavi s nendenaturiranimi bistveno manjša. Razlike v sekvencah povzročijo denaturacijo pri različnih koncentracijah denaturanta, zato se bodo pomnožki ustavili na različnih mestih gela in na ta način jih z DGGE lahko uspešno ločimo (Muyzer in sod., 1993). Informacijo o posamezni populaciji v združbi predstavljata relativna intenzivnost in pozicija vsakega pasu (ang. band) v naboru vseh pomnožkov.

Za optimalno ločevanje PCR pomnožkov z DGGE se je za primerno izkazala vgraditev 40 bp dolge z GC bogate sponse (ang. clamp) v 5' začetni oligonukleotid, saj s tem preprečimo

popoln razpad dvoverižnih DNK pomnožkov. Tako nastane stabilna delno denaturirana molekula (Muyzer in sod., 1993).

Za nadaljnjo karakterizacijo lahko pomnožek DNK izrežemo iz gela, ga znova pomnožimo ali kloniramo in sekvenciramo. Tako lahko dokaj hitro in učinkovito preučimo sestavo kompleksne mikrobne združbe iz naravnih okolij. S to tehniko lahko zaznamo mikrobne vrste, ki v mikrobni združbi predstavljajo manjšino (Muyzer in sod., 1993), teoretični prag je 1 %.

Tako kot druge metode tudi DGGE ni brez omejitev. Vseh populacij, ki sestavljajo neko mikrobno združbo, z analizo DGGE verjetno ne bomo mogli zaznati že zaradi omejitev same izolacije skupne mikrobne DNK in pomnoževanja s PCR. Kljub relativno kratkim pomnožkom, ki jih lahko z DGGE še uspešno ločujemo, lahko sekvence precej zanesljivo taksonomsko uvrstimo. DGGE torej omogoča hitro odkrivanje dominantnih populacij, ki jih lahko pomnožimo s PCR (Ferris in sod., 1996), neposreden prikaz strukture mikrobne združbe in je v primerjavi s kloniranjem in sekvenciranjem precej hitrejša in cenejša metoda.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 VZORČENJE IN OBDELAVA VZORCEV

Morsko dno pred Izolo je močno razčlenjeno, prevladujejo pa globine med 15 in 20 m. Poleg nekaterih vzpetin izstopa do danes odkritih osem izrazitih lijastih sklenjenih kotanj ter troje podolgovatih kotanj v obliki ozkih podmorskih jarkov. Na dnu vseh kotanj so izviri termalne vode z različnimi pretoki. Kotanje so na treh območjih ob zunanji meji Izolskega zaliva in so poimenovane Izola (dve kotanji), Bele skale (dve kotanji) in Ronek (štiri kotanje in trije kanali). Močnejši izviri imajo kotanje lijastih oblik s kratkim breznom ali poudarjeno strmino pri dnu. Šibkejši izviri so brez strmega dna. Mezeče izvire termalne vode so ugotovili tudi vzdolž dna treh ozkih in dolgih podmorskih jarkov. Po velikosti izstopata kotanji izvirov Izola 32 in Ronek 32.

Izvir Izola 32 se zajeda v globine od 19 m do 32 m, z relativno globino kotanje 13 m. Gornji premer kotanje meri okoli 20 m, 3 m globoko brezno pa ima premer 2 m. Pobočja lijaste kotanje so strma (naklon okrog 45°), v breznu na dnu pa navpična in previsna na strani z izvirom. Vsa kotanja se zajeda v sprijete gline in peske, ki jih pokriva tanka rahla plast novih usedlin. Na dnu požene topla voda drobnejše usedline navzgor, v izviru pa ostanejo le nesprijeti večji delci, skozi katere izvira termalna voda. Zaradi kislosti termalne vode so v izviru le mlajše karbonatne usedline. Pretok izvira Izola 32 je ocenjen na 1 m³/min. Temperatura vode (izmerjena na koncu plastične cevi iz izvira) je 29,6 °C (Žumer, 2004)

Vzorčenje sedimenta iz sladkovodnega izvira Izola 32 (geografska pozicija: 45°32,911' in 13°38,761') je potekalo 14. junija 2006. Vzorec je z luknjačem (0,5 m dolga cev iz pleksi stekla s premerom 4,5 cm) odvzel potapljač, potem pa smo ga prenesli v laboratorij in obdelali približno štiri ure po odvzemu. Vzorec smo razdelili na tri podvzorce: podvzorec A predstavlja zgornji sloj (0 do 2 cm), podvzorec B predstavlja srednji sloj (10 do 12 cm) in podvzorec C predstavlja spodnji sloj sedimenta (30 do 32 cm). Podvzorce smo shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2 IZOLACIJA IN GOJENJE SEDIMENTNIH MIKROORGANIZMOV

Mikroorganizme smo gojili na treh različnih agariziranih gojiščih v petrijevkah (15 do 20 ml gojišča). Vsa tri gojišča so temeljila na morskem agarju. Trdno gojišče z morskim agarjem (marine agar, MA) smo pripravili po navodilih proizvajalca (Difco Laboratories, ZDA, sestava je opisana v **Prilogi 2**). 16,53 g sestavine v prahu smo raztopili v 300 ml destilirane vode med nenehnim mešanjem na magnetnem mešalu. Za pripravo gojišča z 1/10 morskega agarja (1/10MA) smo v 300 ml destilirane vode raztopili 1,65 g morskega agarja in 4,5 g bakteriološkega agarja. Za gojišče z 1/10 morskega agarja z gelanskim gumijem (1/10MAgg) smo v 300 ml destilirane vode raztopili 1,36 g morskega agarja, 4,5 g gelanskega gumija pa smo dodali tik pred avtoklaviranjem. Vsa gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem (15 min, 121 °C, nadtlak 1,1 bar). V sterilne petrijevke smo alikvotirali po 15 do 25 ml gojišča. Gojišče z dodanim gelanskim gumijem smo razlivali pri približno 80 °C.

Kulture smo precepljali približno enkrat na tri tedne. Inkubacija je potekala aerobno pri sobni temperaturi in v temi.

3.3 FENOTIPSKI TESTI

3.3.1 Makromorfološki opis

Opisali smo obliko, rob, površino, profil, teksturo, pigmentiranost in prosojnost kolonij, določili pa smo tudi premer kolonije.

3.3.2 Barvanje po Gramu

Razmaz kulture smo posušili in fiksirali nad plamenom in ga nato 1 min barvali s kristalvijoličnim barvilom. Barvilo smo sprali z rahlim curkom vodovodne vode. Nato smo preparat prelili z lugolom, odlili in ponovno prelili z lugolom. Pustili smo 1 min in sprali z rahlim curkom vodovodne vode, nato pa še z mešanico etanola in acetona. Po ponovnem spiranju z vodovodno vodo smo preparat odcedili in prelili s safraninom. Barvali smo 1

min, nato pa smo preparat sprali z vodovodno vodo in posušili. Preparat smo opazovali pod svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi (imerzijski objektiv).

3.4 IZOLACIJA DNK

3.4.1 Izolacija DNK iz sedimentnih vzorcev

Skupno mikrobno DNK smo iz sedimentnih vzorcev izolirali po metodi, ki jo je opisal Zhou s sodelavci (1996). V 2-ml sterilno mikrocentrifugirko smo zatehtali 0,5 g vzorca sedimenta, dodali 1350 μ l ekstrakcijskega pufra (pH 8,0) in premešali. Dodali smo 10 μ l proteinaze K (10 mg/ml). Po tridesetminutnem stresanju pri 37 °C in 225 obratih na minuto smo dodali 150 μ l 20 % SDS. Inkubirali smo dve uri pri 65 °C in vmes vsakih 15 min nežno premešali. Po desetminutnem centrifugiranju pri 6000 $\times$ g in sobni temperaturi smo supernatant prenesli v svežo mikrocentrifugirko. Pelet smo nato še dvakrat obdelali, in sicer tako, da smo dodali 450 μ l ekstrakcijskega pufra in 50 μ l 20 % SDS. Mešanico smo premešali na vrtničnem mešalu, nato pa je sledila desetminutna inkubacija pri 65 °C in centrifugiranje (tako kot prej). Vse supernatante smo združili v novi mikrocentrifugirki in izmerili njihov volumen. Dodali smo enak volumen mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 24:25:1 (v/v/v), nežno premešali in centrifugirali pri 10000 $\times$ g 5 min. Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 0,6 volumna izopropanola in 1 uro inkubirali pri sobni temperaturi. Po dvajsetminutnem centrifugiranju pri 16000 $\times$ g in sobni temperaturi smo supernatant odstranili, pelet pa smo sprali s 500 μ l ledeno mrzlega 70 % etanola. Ves etanol smo odstranili, usedlino osušili in resuspendirali v 50 μ l vode MiliQ. Izolirano DNK smo do nadaljne uporabe shranili pri -20° C. Uspešnost izolacije smo preverili z gelsko elektroforezo.

3.4.2 Izolacija DNK iz čistih mikrobnih kultur

Pri prvih poskusih izolacije DNK iz čistih mikrobnih kultur smo DNK izolirali iz tekoče kulture. Ker pa s trdnih gojišč lahko postrgamo večje število celic, smo v nadaljevanju DNK izolirali iz kultur, ki so zrasle na trdnih gojiščih. Izjema pa je bil izolat I₃₂2-7, ki se je vraščal v agar, zato smo morali DNK izolirati iz tekoče kulture.

S sterilno cepilno zanko smo kulturo postrgali s trdnega gojišča in jo suspendirali v 567 μ l pufra TE (pH 8,0). Pri nekaterih čistih kulturah smo DNK izolirali iz tekoče kulture. V tem primeru smo kulturo odpipetirali v mikrocentrifugirko in 10 min centrifugirali pri 2000 $\times$ g in 4 °C. Usedlino smo nato ponovno suspendirali v 567 μ l pufra TE. Od tod dalje je bil postopek s celicami dobljenimi iz trdnega in iz tekočega gojišča enak. V pufru ponovno suspendiranim celicam smo dodali 3 μ l proteinaze K in 30 μ l 10 % SDS. Vse skupaj smo eno uro inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C, nato pa smo dodali 100 μ l 5M NaCl ter premešali. Nato smo dodali 80 μ l na 65 °C segretega CTAB/NaCl in ponovno premešali. Po desetminutni inkubaciji pri 65 °C smo dodali enak volumen mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol (FKI) v razmerju 24:25:1 (v/v/v) ter zaprto mikrocentrifugirko nekajkrat nežno obrnili. Po petminutnem centrifugiranju pri 12000 $\times$ g in sobni temperaturi smo vodno fazo prenesli v novo mikrocentrifugirko, ponovno dodali enak volumen FKI, nežno premešali in centrifugirali. Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 0,6 volumna izopropanola. Po centrifugiranju (12000 $\times$ g, 5 min, sobna temperatura) smo odstranili supernatant in usedlino sprali s 500 μ l ledeno mrzlega 70 % etanola. Etanol smo odstranili, usedlino pa osušili in ponovno suspendirali v 50 μ l 1 mM Tris (pH 8,0). Izolirano DNK smo do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C. Uspešnost izolacije smo preverili z gelsko elektroforezo.

3.5 POMNOŽEVANJE 16S rDNK V VERIŽNI REAKCIJI S POLIMERAZO (PCR)

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200- μ l mikrocentrifugirkah. Reakcijske mešanice so opisane pod točkama 3.5.1 in 3.5.2. Pomnoževanje je potekalo v cikličnem termostatu MyCycler thermal cycler (BioRad). Uspešnost reakcij smo preverjali z gelsko elektroforezo.

3.5.1 Pomnoževanje dela 16S rDNK za denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo (DGGE)

3.5.1.1 Začetna oligonukleotida F338gc in 518R

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 0,15 mM vsakega od deoksiribonukleotidov; 1,875 mM MgCl₂; 1 $\times$ PCR pufer (Fermentas Life Sciences); 0,15 μ M vsakega od začetnih

oligonukleotidov (F338gc v 3' smeri kodirajoče verige in 518R v 5' smeri kodirajoče verige); 0,5 µl rekombinantne DNK-polimeraze iz *Thermus aquaticus* (Fermentas Life Sciences); 1 µl DNK ter vodo MiliQ do 50 µl. Program PCR je prikazan v **Preglednici 2**, uporabljeni začetni oligonukleotidi pa v **Preglednici 5**.

Preglednica 2: Program PCR

Oznaka	T [°C]	t	Št. ciklov
Predcikel	94	3 min	1
Denaturacija	94	45 s	
Prileganje zač. olig.	56	30 s	33
Podaljševanje	72	20 s	
Podaljšana polim.	72	10 min	1
Vzdrževanje	4	∞	1

3.5.1.2 Začetna oligonukleotida F968gc in 1401R

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 0,2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov; 2 mM MgCl₂; 1× PCR pufer (Fermentas Life Sciences); 0,25 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov (F968gc v 3' smeri kodirajoče verige in 1401R v 5' smeri kodirajoče verige); 0,5 µl rekombinantne DNK-polimeraze iz *Thermus aquaticus* (Fermentas Life Sciences); 1 µl DNK ter vodo MiliQ do 50 µl. Program PCR je prikazan v **Preglednici 3**, uporabljeni začetni oligonukleotidi pa v **Preglednici 5**.

Preglednica 3: Program PCR

Oznaka	T [°C]	t	Št. ciklov
Predcikel	95	3 min	1
Denaturacija	95	30 s	
Prileganje zač. olig.	56	30 s	30
Podaljševanje	72	1 min	
Podaljšana polim.	72	10 min	1
Vzdrževanje	4	∞	1

3.5.2 Pomnoževanje 16S rDNK za sekvenciranje

Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala 0,2 mM vsakega od deoksiribonukleotidov; 2 mM MgCl₂; 1× PCR pufer (Fermentas Life Sciences); 0,25 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov (fD1 ali Eub338f v 3' smeri kodirajoče verige in 1392RU v 5' smeri

kodirajoče verige); 0,5 µl rekombinantne DNK-polimeraze iz *Thermus aquaticus* (Fermentas Life Sciences); 1 µl DNK ter vodo MiliQ do 50 µl. Program PCR je prikazan v **Preglednici 4**, uporabljeni začetni oligonukleotidi pa v **Preglednici 5**.

Preglednica 4: Program PCR

Oznaka	T [°C]	t	Št. ciklov
Predcikel	95	3 min	1
Denaturacija	95	30 s	
Prileganje zač. olig.	56	30 (45) s	25 - 30
Podaljševanje	72	1:20 min	
Podaljšana polim.	72	12 min	1
Vzdrževanje	4	∞	1

3.5.3 Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v diplomski nalogi

Preglednica 5: Začetni oligonukleotidi

Oznaka	Zaporedje	T _m	Vir
F338gc	5' - cgcccgccgcgccccgcgccggcccgccgcgcgcACTCCTACGG GAGGCAGCAG - 3'	>75°C	Tong in sod., 2007
518R	5' - GTATTACCGCGGCTGCTGG - 3'	61,0°C	Muyzer in sod., 1993
F968gc	5' - cgcccgggcgcgccccggcgggcgggggcacgggggAACGCGAA GAACCTTAC - 3'	84,9°C	Nübel in sod., 1996
1401R	5' - GCGTGTGTACAAGACCC - 3'		Nübel in sod., 1996
fD1	5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'	57,3°C	Weisburg in sod., 1991
Eub338f	5' - ACTCCTACGGGAGGCAGC - 3'	60,5°C	Amman in sod., 1995
1392RU	5' - ACGGGCGGTGTGTAGC - 3'	54,7°C	Fish in sod., 2002

3.6 HORIZONTALNA AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Z agarosno gelsko elektroforezo smo preverjali uspešnost izolacije DNK ter prisotnost, velikost in količino produkta verižne reakcije s polimerazo. Pripravljali smo 1-odstotne, 1,5-odstotne in 2-odstotne (za čiščenje PCR produktov iz gela) gele. Agarozo smo raztopili v 0,5× pufru TBE, raztopino smo vlili v vpet nosilec za gel z vstavljenim glavnikom in

pustili, da pri sobni temperaturi polimerizira. Nato smo glavniki odstranili, gel pa prestavili v banjico z elektroforetskim pufrom ($0,5\times$ TBE). V jamice gela smo vnesli mešanico vzorca in nanašalnega pufrja v razmerju 1:6. Ob vzorcih smo na vsak gel nanesti 1 kb lestvico, ki je vsebovala DNK fragmente naslednjih velikosti: 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4500 bp, 4000 bp, 3500 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp (Fermentas Life Sciences). Elektroforeza je tekla 40 do 60 minut pri napetosti 5 V/cm in toku 400 mA, v anodni smeri. DNK v gelu smo po elektroforezi obarvali v raztopini etidijevega bromida v destilirani vodi. Barvanje je trajalo 5 do 15 minut, sledilo pa je spiranje v destilirani vodi, ki je trajalo približno 10 minut. Z EtBr barvano DNK v gelu smo odkrivali z vzbujanjem pri valovni dolžini 254 nm in sliko dokumentirali s sistemom GelDoc (Bio-Rad, ZDA). Fotografije smo obdelali s programom Molecular Analyst Software.

3.7 ANALIZA DOLŽINE PCR POMNOŽKOV Z BIOANALIZATORJEM AGILENT 2100

Produkte verižne reakcije s polimerazo, ki smo jih dobili pri pomnoževanju z začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R smo elektroforetsko ločili z Agilent Bioanalizatorjem 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornija, ZDA), ki je avtomatiziran sistem za ugotavljanje velikosti in količine fragmentov DNK. Čip za ločevanje dvoverižne DNK v velikostnem območju 25-1000 bp (Agilent DNA 1000 Series II Kit) smo pripravili po navodilih proizvajalca. Pripravljen čip smo vstavili v bioanalizator. Vzorci so pri visoki napetosti potovali skozi mikrokanale v čipu, kar je uravnavala računalniško nadzorovana serija elektrod. Na izteku mikročipa je laserski detektor meril fluorescenco barvila, ki se je integriralo v DNK fragmente. Na osnovi količine oddane svetlobe in izmerjenega časa izpiranja v primerjavi s standardi je bioanalizator izračunal jakost signala in na ta način določil količino in velikost fragmentov DNK v preiskovanih vzorcih.

3.8 DENATURACIJSKA GRADIENTNA GELSKA ELEKTROFOREZA (DGGE)

Nosilec za gel smo pripravili po navodilih proizvajalca (Bio-Rad, ZDA).

Pripravili smo mešanico za dva gela. Za gel, ki je vseboval ureo kot denaturant (založna raztopina 1), smo v stekleno čašo zatehtali 15,12 g 7 M uree. Dodali smo 14,4 ml formamida in 0,72 ml 50× TAE pufra, potem pa še 1,58 ml čistega akrilamida in 5,62 ml mešanice akrilamida in bisakrilamida z razmerjem A:BA je 29:1, tako da smo dobili končno razmerje A:BA je 37,5:1. Mešanico smo mešali na magnetnem mešalu in rahlo segrevali dokler se urea ni popolnoma raztopila. Nato smo dodali vodo MiliQ do končnega volumna 36 ml in ponovno zmešali na mešalu. Za gel brez denaturanta (založna raztopina 2) smo 0,64 ml 50× TAE pufra dodali 1,4 ml čistega akrilamida in 5 ml mešanice akrilamida in bisakrilamida (A:BA je 29:1), tako da je bilo končno razmerje A:BA je 37,5:1. Dodali smo vodo MiliQ do 32 ml in na mešalu dobro premešali. Za DGGE smo uporabili 40 do 65-odstotne gradiente. Za en gel smo za višjo koncentracijo denaturanta (65 %, H) v plastični posodici zmešali 10,4 ml založne raztopine 1 in 5,6 ml založne raztopine 2, za nižjo koncentracijo denaturanta (40 %, L) pa smo zmešali 6,4 ml založne raztopine 1 in 9,6 ml založne raztopine 2. Tik pred vlivanjem gela smo v vsako plastično posodico dodali 125 µl amonijevega persulfata (APS; pripravljali smo ga sproti, v mikrocentrifugirko smo zatehtali 0,1 g trdnega APS in dodali vodo MiliQ do 1 ml) in 5,2 µl TEMED-a ter dobro premešali. S H mešanico smo napolnili eno plastično brizgo do oznake 15 ml, drugo pa smo napolnili z L mešanico. Obe brizgi smo nato pritrdili na napravo za pripravo gradientnega gela in vlili gel. Na koncu smo na vrhu gela vstavili še glavnik. Gel smo pustili polimerizirati 3 ure. Ko je gel polimeriziral, smo odstranili glavnike in žepke sprali z 1× TAE pufrom. Elektroforezno posodo za DGGE smo napolnili z 1× TAE pufrom. Pred nalaganjem vzorcev na gel smo gel segreli na 64 °C (nekaj °C več kot je potrebno za DGGE, saj se gel med nalaganjem vzorcev ohlaja). Vzorcem smo dodali 1 µl pufra za nalaganje več (LB z glicerolom) kot je bilo vzorca, in jih s pipeto naložili na gel. Elektroforeza je tekla pri konstantni napetosti 75 V in temperaturi 60 °C v anodni smeri 17 ur. Po končani elektroforezi smo gele previdno odstranili iz sistema steklenih plošč in jih obarvali v raztopini SYBR green. Barvanje je trajalo 30 min, sledilo pa je še nekajminutno spiranje v destilirani vodi. DNK v gelu smo odkrivali z vzbujanjem z modro

svetlobo in sliko dokumentirali s sistemom gel doc (Syngene, Velika Britanija). Fotografijo smo posneli in obdelali s programom GeneSnap, podatke pa smo obdelali s programoma GeneTools (Syngene, Velika Britanija) in BioNumerics (Applied Maths, Belgija).

3.9 ČIŠČENJE DNK IZ AGAROSNEGA GELA

Agarozno gelsko elektroforezo smo naredili po enakem postopku, kot je opisano pod točko 3.6. Izmerili smo širino in dolžino gela in natisnili sliko gela v naravni velikosti. Sliko gela smo dali v prozorno plastično mapo, na sliko pa smo položili gel in ga dobro pritrdili. S skalpelom smo nato izrezali iz gela zelene fragmente glede na fotografijo. Po rezanju smo gel še enkrat pogledali s sistemom GelDoc in preverili, ali je bilo rezanje uspešno. DNK smo iz gela očistili z reagenti kompleta QIAquick Gel Extraction Kit, delali pa smo po navodilih proizvajalca (QIAGEN).

3.10 OBDELAVA 16S rDNK SEKVENC

Sekvence 16S rDNK smo taksonomsko uvrstili glede na baze podatkov RDP II.9 z orodjem Classifier, rezultate pa smo preverili še v bazah podatkov EBI z orodjem Fasta nucleotide in NCBI z orodjem Blast. V bazi podatkov RDP II.9 smo z orodjem Hierarchy Browser poiskali več sekvenc, filogenetsko sorodnih sekvenci, ter eno bolj oddaljeno sekvenco. Vse izbrane sekvence smo shranili in jih obdelali s filogenetskimi prijemi, vključenimi v programski paket MEGA 4.0 (Kumar in sod., 2004).

3.11 RAZTOPINE IN PUFRI

3.11.1 Barvanje po Gramu

Kristalvijolično barvilo: delovna raztopina vsebuje 20 ml raztopine A in 80 ml raztopine B.

Raztopina A (10 % (w/v) kristalvijolično barvilo v 95 % (v/v) etanolu): 10 g kristalvijoličnega barvila smo raztopili v 100 ml 95 % (v/v) etanola.

Raztopina B (0,01 % (w/v) vodna raztopina amonijevega oksalata): 0,8 g amonijevega oksalata, $(\text{NH}_4)_2(\text{COO})_2$ smo raztopili v 80 ml destilirane vode.

Lugol: 5 g I_2 , 10 g IK ter 100 ml destilirane vode

Etanol/acetona v razmerju 1:9: 10 % (v/v) acetona, 90 % (v/v) absolutnega etanola

Safranin: 0,25 % (w/v) safranina v vodi

3.11.2 Izolacija DNK

Ekstrakcijski pufer

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)

100 mM EDTA (etilendiaminotetraoetna kislina) (pH 8,0)

100mM natrijev fosfat (pH 8,0)

1,5 M NaCl (natrijev klorid)

1 % CTAB

10 % SDS: 10 % (w/v) natrijev dodecilsulfat v vodi

20 % SDS: 20 % (w/v) natrijev dodecilsulfat v vodi

Motna raztopina se zbistri med inkubacijo pri 37°C.

10× Tris EDTA (TE) pH 8,0

100mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA

CTAB/NaCl: 10 % (w/v) heksadeciltrimetilamonijev bromid; 0,7 M NaCl

10 g CTAB

4,09 g NaCl

destilirana voda do 100 ml

5 M NaCl: 292,9 g NaCl smo raztopili v 800 ml destilirane vode, dopolnili do 1000 ml in sterilizirali z avtoklaviranjem.

3.11.3 Horizontalna agarozna gelska elektroforeza

5× TBE (Tris-boratni pufer)

54 g Tris baze

27,5 g H₃BO₃

20 ml 0,5 M EDTA

destilirana voda do 1000 ml

Etidijev bromid (EtBr): delovno raztopino smo pripravili iz založne raztopine in destilirane (1 µg/ml) vode.

3.11.4 DGGE

APS: amonijev persulfat, 10 % (w/v) raztopina v vodi MiliQ

50× TAE (Tris-acetatni pufer)

242 g Tris baze

57,1 ml ledocetne kisline

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

SYBR green (1× raztopina)

198 ml destilirane vode

4 ml 50× TAE pufra

20 µl 10000× založne raztopine SYBR green

4 REZULTATI

4.1 MAKROMORFOLOŠKI IN MIKROMORFOLOŠKI OPIS

Za namen obravnave v diplomski nalogi smo vzorce sedimenta podvodnega izvira Izola 32 nacepili na tri različna gojišča. Na vsakem gojišču smo izbrali 10 zraslih kolonij in jih s precepljanjem prečistili do čiste kulture. Med tem postopkom smo nekaj izolatov izgubili (po precepljanju niso več zrasli). Ohranili in podrobneje preučili smo 24 izolatov. Izolate, označene z I₃₂1- smo vzgajali na trdnem gojišču MA (morski agar), izolate I₃₂2- na trdnem gojišču 1/10MA in izolate I₃₂3- na gojišču 1/10MAgg (1/10MA z dodanim gelanskim gumijem).

Pri opazovanju celic pod mikroskopom smo poleg barvanja po Gramu in oblike celic preverjali tudi čistost kultur. Ugotovili smo, da so bili vsi izolati homogeni, t.j. opazili smo le celice z enakim tipom celične stene, ki so bile tudi morfološko podobne.

V **Preglednici 6** so zbrani podatki o barvanju po Gramu, obliki celic in makromorfološki opis čistih izolatov iz sedimentov sladkovodnega izvira Izola 32.

Pri mikroskopskem pregledovanju izolatov smo večinoma opazili celice treh morfotipov: (i) večje ovalne celice, ki se barvajo po Gramu pozitivno, (ii) majhni koki, ki se barvajo po Gramu pozitivno in (iii) majhni koki, ki se barvajo po Gramu negativno. V nekaterih primerih so bile celice med seboj povezane v krajše verižice ali skupke. Več kot polovica izolatov (13/24) se je barvala nedvoumno po Gramu negativno, večina teh (8) je rasla na gojišču MA. Na gojišču 1/10MA oziroma 1/10MAgg so zrasli le trije oziroma dva po Gramu negativna koka. Ostali izolati (11) so se barvali nedvoumno po Gramu pozitivno in večina teh je rasla na gojiščih 1/10MA (5) in 1/10MAgg (5).

Kolonije večine (9/13) po Gramu negativnih izolatov so krem barve, kolonije ostalih po Gramu negativnih izolatov pa so bele (2), oranžno obarvane (1), ali rumene (1).

Pri po Gramu pozitivnih izstopa večja skupina štirih izolatov (velikih kokov), pri katerih so kolonije rožnate. Ostali po Gramu pozitivni izolati tvorijo morfološko različne kolonije.

Zanimivo je, da so na bolj redčenem gojišču zrastle bolj raznoliki izolati. Vse kolonije so okrogle oblike in, z eno izjemo, rastejo na površini trdnega gojišča. Izolat I₃₂2-7 se vjeda v agar. Izolati tvorijo kolonije različnih barv, prevladujejo pa kolonije krem barve, šest je belih, štirje so že omenjeni rožnati, dva sta rumena in eden je oranžne barve. Velika večina kolonij je gladkih in svetlečih, izjemi sta izolata I₃₂3-5 in I₃₂3-7, ki tvorita gladke motne kolonije.

Preglednica 6: Opis celic in kolonij 24 domnevno čistih izolatov iz sedimentov sladkovodnega izvira Izola 32.

Gojišče	Izolat	Mikromorfološki opis	Makromorfološki opis
MA	I ₃₂ 1-2	G–, majhni koki	Krem, neprosojna, popkasto dvignjena, cel rob
	I ₃₂ 1-5	G–, majhni koki	Krem, neprosojna, popkasto dvignjena, rahlo valovit rob
	I ₃₂ 1-6	G–, majhni koki	Krem, neprosojna, izbokla, cel rob
	I ₃₂ 1-7	G–, majhni koki	Krem, neprosojna, izbokla, cel rob
	I ₃₂ 1-8	G–, majhni koki	Krem, neprosojna, izbokla, cel rob
	I ₃₂ 1-9	G–, majhni koki	Krem, neprosojna, izbokla, cel rob
	I ₃₂ 1-10	G–, majhni koki	Krem, prosojna, izbokla, rahlo valovit rob
	I ₃₂ 1-11	G–, majhni koki	Krem, prosojna, izbokla, cel rob
	I ₃₂ 1-12	G+, koki, kratke verižice	Krem, neprosojna, popkasto dvignjena, cel rob
1/10MA	I ₃₂ 2-1	G–, majhni koki, posamezno ali verižice	Oranžna, neprosojna, popkasto dvignjena, cel rob
	I ₃₂ 2-2	G–, majhni koki, posamezno ali verižice	Rumena, prosojna, izbokla, cel rob
	I ₃₂ 2-4	G–, zelo drobni koki	Krem, neprosojna, dvignjena, cel rob
	I ₃₂ 2-5	G+ koki, kratke verižice	Bela, neprosojna, izbokla, cel rob
	I ₃₂ 2-7	G+ koki, celice med seboj povezane v verižice	Bela, neprosojna, popkasto dvignjena, cel rob, vrašča v agar
	I ₃₂ 2-8	G+, koki, po 2 ali 3 skupaj	Bela, prosojna, izbokla, valovit rob
	I ₃₂ 2-9	G–, majhni koki	Oranžna, prosojna, dvignjena, cel rob
	I ₃₂ 2-10	G+, velike, ovalne celice	Rožnata, neprosojna, popkasto dvignjena, cel rob
1/10MAgg	I ₃₂ 3-2	G–, majhni koki	Bela, prosojna, dvignjena, cel rob
	I ₃₂ 3-3	G–, majhni koki	Bela, neprosojna, popkasto dvignjena, valovit rob
	I ₃₂ 3-4	G+, velike ovalne celice	Rožnata, neprosojna, popkasto dvignjena, valovit rob
	I ₃₂ 3-5	G+, majhni koki v skupkih po 4	Rumena, neprosojna, motna, dvignjena, cel rob
	I ₃₂ 3-6	G+, velike ovalne celice	Rožnata, neprosojna, popkasto dvignjena, valovit rob
	I ₃₂ 3-7	G+, majhni koki v skupkih po 4	Bela, neprosojna, dvignjena, cel rob
	I ₃₂ 3-9	G+, velike ovalne celice	Rožnata, neprosojna, izbokla, naguban rob

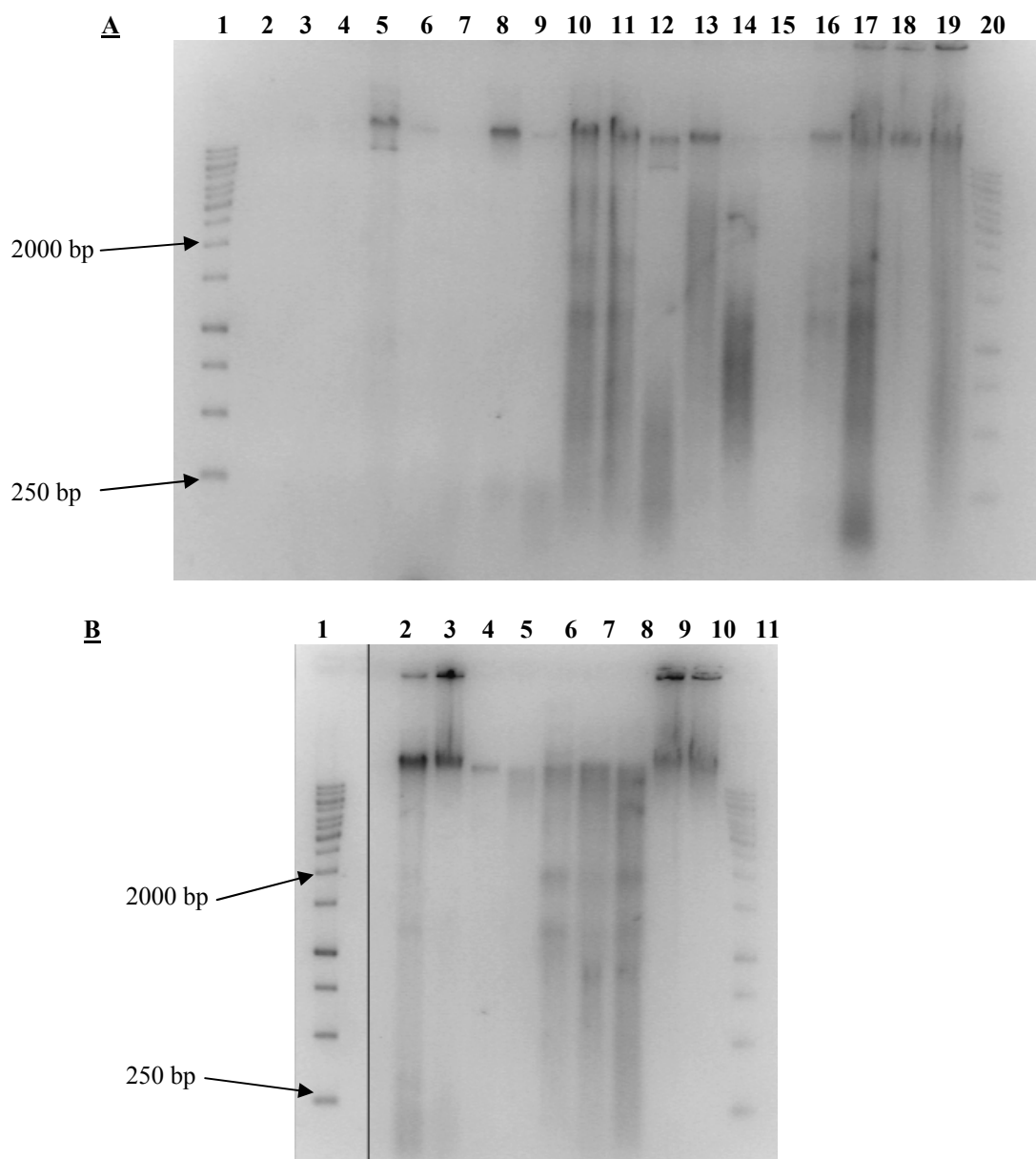
4.2 IZOLACIJA GENOMSKE DNK

Za analizo sekvenc genov za 16S rRNK smo najprej direktno iz vzorcev sedimenta in kasneje tudi iz čistih bakterijskih kultur izolirali celotno genomsko DNK. Čeprav je bila količina izolirane DNK iz nekaterih vzorcev tako majhna, da smo jo na gelu komaj opazili, smo je vseeno uspeli izolirati dovolj za uspešno pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo. Volumen izolirane DNK je bil v vseh primerih 50 µl. V **Preglednici 7** so prikazane oznake posameznih vzorcev, njihov izvor in vidnost DNK na gelu.

Preglednica 7: Uspešnost izolacije genomske DNK iz vzorcev sedimenta priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 in iz izolatov

Sediment [globina]	Oznaka	Vidnost DNK na gelu
0 do 2 cm	A	-
10 do 12 cm	B	-
30 do 32 cm	C	-
Gojišče	Izolat / Oznaka	Vidnost DNK na gelu
Marine agar	I ₃₂ 1-2, I ₃₂ 1-5, I ₃₂ 1-6, I ₃₂ 1-7, I ₃₂ 1-8, I ₃₂ 1-9, I ₃₂ 1-10, I ₃₂ 1-11, I ₃₂ 1-12	+
10× redčen Marine agar	I ₃₂ 2-1, I ₃₂ 2-2, I ₃₂ 2-4, I ₃₂ 2-5, I ₃₂ 2-7, I ₃₂ 2-8, I ₃₂ 2-9, I ₃₂ 2-10	+
	I ₃₂ 2-7	-
10× redčen Marine agar + gelanski gumi	I ₃₂ 3-2, I ₃₂ 3-3, I ₃₂ 3-4, I ₃₂ 3-5, I ₃₂ 3-7, I ₃₂ 3-9	+
	I ₃₂ 3-6	-

Slika 3 (naslednja stran) prikazuje elektroforetsko ločitev izolirane genomske DNK.



Slika 3: Elektroforetska ločitev mikrobne genske DNK, izolirane iz vzorcev sedimenta priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 in iz izolatov. Nanesli smo 5 μ l vzorca. Od leve proti desni si sledijo:

A) 1 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences), 2 – skupna mikrobna DNK iz sedimentnega vzorca C, 3 – skupna mikrobna DNK iz sedimentnega vzorca B, 4 – skupna mikrobna DNK iz sedimentnega vzorca A, 5 – genska DNK seva I_{323-9} , 6 – I_{323-7} , 7 – I_{323-6} , 8 – I_{323-5} , 9 – I_{323-4} , 10 – I_{323-3} , 11 – I_{323-2} , 12 – I_{322-10} , 13 – I_{322-9} , 14 – I_{322-8} , 15 – I_{322-7} , 16 – I_{322-5} , 17 – I_{322-4} , 18 – I_{322-2} , 19 – I_{322-1} , 20 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences);

B) 1 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences), 2 – genska DNK seva I_{321-12} , 3 – I_{321-11} , 4 – I_{321-10} , 5 – I_{321-9} , 6 – I_{321-8} , 7 – I_{321-7} , 8 – I_{321-6} , 9 – I_{321-5} , 10 – I_{321-2} , 11 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences).

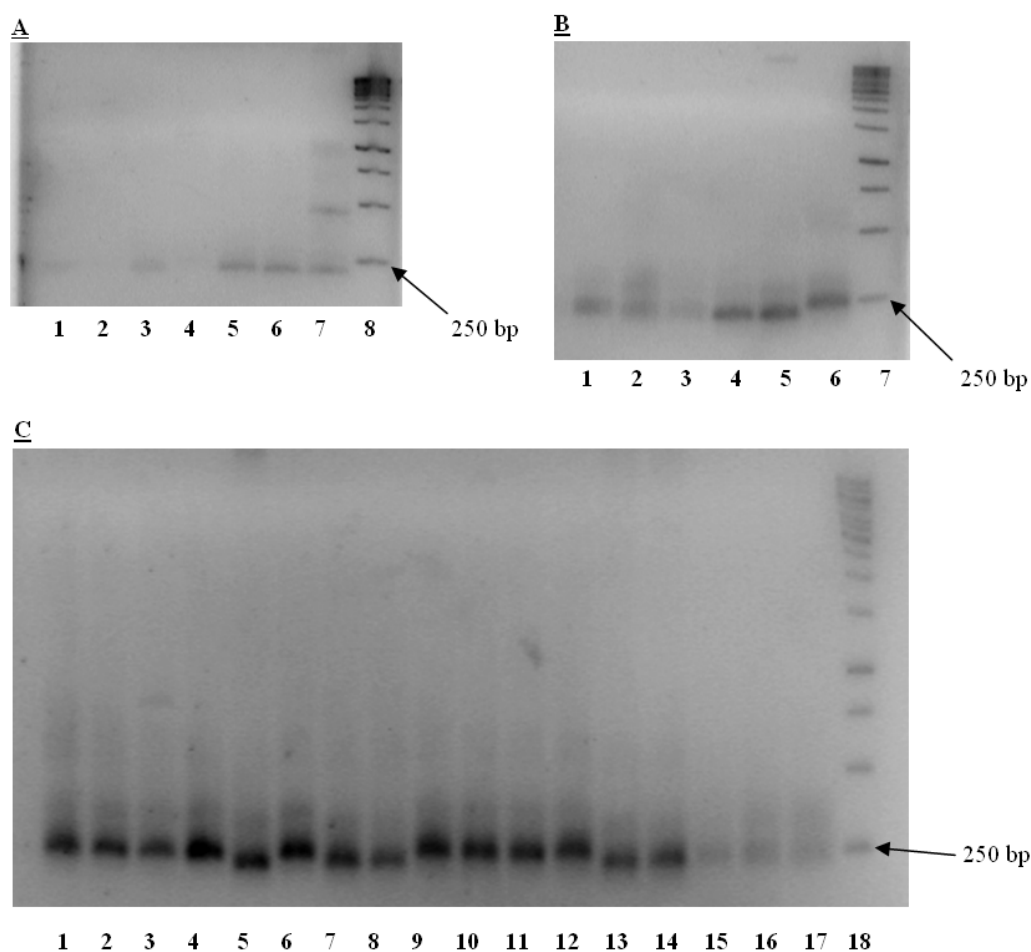
Po analizi rezultatov gelske elektroforeze smo lahko ugotovili, da je bila koncentracija genomske DNK, izolirane iz čistih kultur, razen v dveh primerih (I₃₂2-7 in I₃₂2-6) dovolj velika, da smo jo po elektroforezi na gelu lahko opazili. Pri večini od teh vzorcev je bila genomska DNK dokaj neraztrgana in bistveno večja od največjega fragmenta velikostnega standarda (10 kbp). Pri sedmih vzorcih (17A, 18A, 19A, 2B, 3B, 9B in 10B) je del genomske DNK ostal v žepkih, kar kaže na ohranjenost visokomolekularne genomske DNK, prisotnost enoverižne DNK ali onesnaženost z beljakovinami. Pri večini vzorcev smo opazili sledi bodisi razgrajene DNK bodisi drugega materiala (morebitni polisaharidi) vzdolž elektroforetske poti vzorcev.

Genomske DNK, izolirane direktno iz vzorcev sedimenta, na agaroznih gelih nismo opazili.

4.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

4.3.1 Pomnoževanje dela 16S rDNK kot predstopnja denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE)

Najprej smo bakterijske gene oziroma dele genov za 16S rRNK poskusili pomnožiti z evolucijsko ohranjenima začetnima oligonukleotidoma F968gc in 1401R. Po elektroforetski ločitvi produktov PCR v agaroznem gelu smo opazili okrog 500 bp dolge produkte pomnoževanja, a le pri sedmih vzorcih (I₃₂3-4, I₃₂3-6, I₃₂3-9, I₃₂2-1, I₃₂2-2, I₃₂2-9, I₃₂2-10) (ni prikazano). Ker smo hoteli pomnožiti DNK iz vseh vzorcev, smo uporabili še druge evolucijsko ohranjene začetne oligonukleotide in spremenjen program PCR. Dele genov za 16S rRNK smo pomnožili z začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R. PCR je bil uspešen pri vseh vzorcih, pomnožili smo približno 250 bp dolge produkte. Na sliki A se vzorcev A1, A2 in A4 sicer ne vidi, vendar je to posledica slabše kakovosti fotografije, morda manj učinkovitega pomnoževanja v primerjavi z drugimi vzorci in dejstva, da smo na gel nanесли le ¼ volumna reakcije PCR. Ribosomske gene teh vzorcev smo sicer uspešno pomnožili za analizo DGGE (Slika 7, linije B12, B11 in B10). Elektroforetska ločitev pomnoženih produktov je prikazana na **Sliki 4**.



Slika 4 : Elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja 16S rDNK, izolirane iz vzorcev sedimenta priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 in iz izolatov, s PCR in začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R. Nanesli smo 5 μ l vzorca.

A) 1 – I₃₂₃-9, 2 – I₃₂₃-6, 3 – I₃₂₃-4, 4 – I₃₂₂-10, 5 – I₃₂₂-9, 6 – I₃₂₂-2, 7 – I₃₂₂-1, 8 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences);

B) 1 – C, 2 – B, 3 – A, 4 – I₃₂₃-7, 5 – I₃₂₃-5, 6 – I₃₂₃-3, 7 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences);

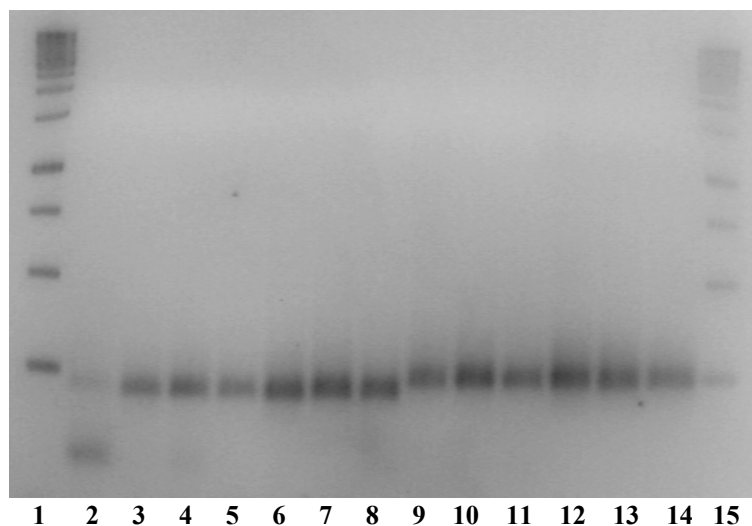
C) 1 – I₃₂₃-2, 2 – I₃₂₂-8, 3 – I₃₂₂-7, 4 – I₃₂₂-5, 5 – I₃₂₂-4, 6 – I₃₂₁-12, 7 – I₃₂₁-11, 8 – I₃₂₁-10, 9 – I₃₂₁-9, 10 – I₃₂₁-8, 11 – I₃₂₁-7, 12 – I₃₂₁-6, 13 – I₃₂₁-5, 14 – I₃₂₁-2, 15 – C, 16 – B, 17 – A, 18 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences).

Po analizi rezultatov agarozne gelske elektroforeze smo ugotovili, da je pričakovani pomnožek PCR nastal pri vseh vzorcih. V nekaterih primerih (1, 2, 3, 4 slika 3A in 3 slika 3B) je bilo pomnožka manj, a smo ga še vedno lahko opazili. V liniji 7 na sliki 3A so prisotni tudi nespecifični produkti pomnoževanja. Ker je njihova velikost nekoliko manjša

kot 500 bp predvidevamo, da gre morda za dimerne produkte reakcije PCR. Bolj zanimivo opažanje pa je, da vsi pomnožki niso bili enako veliki. To se še posebno jasno vidi na sliki 3C, na kateri lahko prepoznamo vsaj dva različna tipa pomnožkov.

4.3.1.1 Gradientna verižna reakcija s polimerazo

Ker smo pri pomnoževanju genov za 16S rRNK s PCR opazili pomnožke različnih dolžin, smo pripravili gradientno verižno reakcijo s polimerazo, v kateri smo želeli ugotoviti razloge za nastanek različno dolgih pomnožkov pri pomnoževanju s PCR. Preverjali smo vpliv redčitve matrične DNK (10× in 100× redčena DNK) in vpliv temperature naleganja začetnih oligonukleotidov na dolžino pomnožka (tri različne temperature: 56°C, 64,5°C in 70°C). Za ta poskus smo izbrali genomsko DNK dveh sevov, vsak je bil predstavnik ene skupine sevov glede na dolžino PCR pomnožka (manjši, večji). Ugotovili smo, da preučena dejavnika (koncentracija matrične DNK in temperatura naleganja začetnih oligonukleotidov) na dolžino pomnožka ne vplivata, še vedno je opazna jasna razlika med vzorcema. Elektroforetska ločitev pomnoženih produktov je prikazana na **Sliki 5**.



Slika 5: Elektroforetska ločitev produktov pomnoževanja 16S rDNK izolatov I₃₂1-9 in I₃₂1-10 s PCR in začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R. Nanesli smo 5 µl vzorca. V oklepajih so podane temperature prileganja začetnih oligonukleotidov. Liniji 1 in 15 – velikostni standard (1 kb lestvica, Fermentas Life Sciences), 2 – negativna kontrola; 3 (56 °C), 4 (64,5°C), 5 (70 °C) - 100× redčen I₃₂1-10; 6 (56 °C), 7 (64,5°C), 8 (70 °C) - 10× redčen I₃₂1-10; 9 (56 °C), 10 (64,5°C), 11 (70 °C) - 100× redčen I₃₂1-9; 12 (56 °C), 13, 14 (70 °C) - 10× redčen I₃₂1-9.

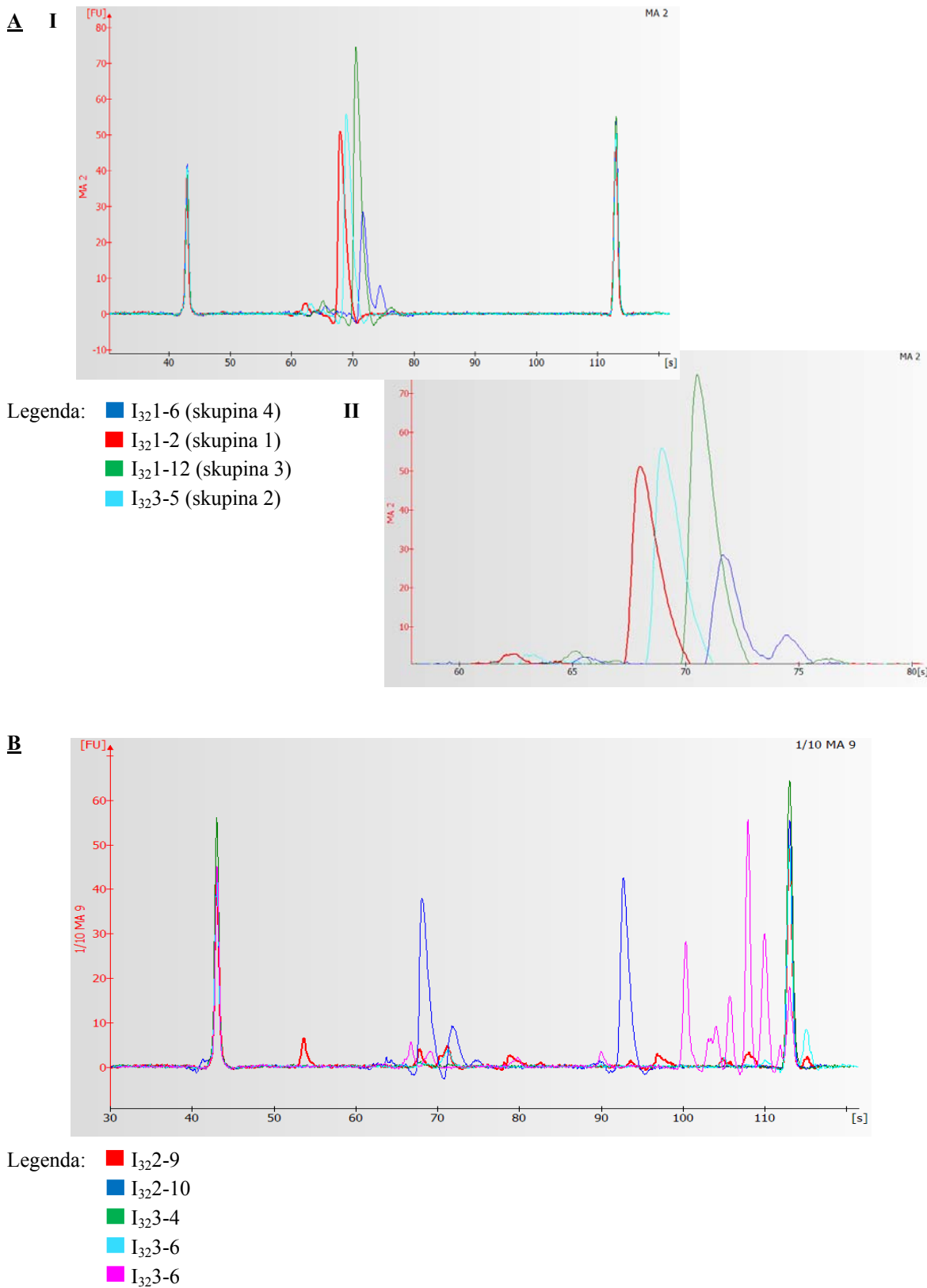
4.4 ANALIZA DOLŽINE PCR POMNOŽKOV Z BIOANALIZATORJEM AGILENT 2100

Z analizo pomnožkov z bioanalizatorjem smo skušali ugotoviti točne dolžine pomnožkov in ugotoviti za koliko se pomnožki verižne reakcije s polimerazo med seboj dejansko razlikujejo. Glede na dolžino pomnožkov smo lahko 19 izolatov uvrstili v štiri skupine, preostalih pet izolatov pa smo uvrstili v peto skupino, ki združuje različne izolate. Razdelitev v skupine je prikazana v **Preglednici 8**.

Preglednica 8: Razdelitev izolatov v skupine glede na analizo dolžine pomnožkov PCR z bioanalizatorjem Agilent 2100 in dolžina pomnožkov.

Razred	Izolat	Dolžina pomnožka [bp]
SKUPINA 1	I ₃₂ 1-2, I ₃₂ 1-5, I ₃₂ 1-10, I ₃₂ 1-11, I ₃₂ 2-1, I ₃₂ 2-2, I ₃₂ 2-8	213 - 218
SKUPINA 2	I ₃₂ 3-5, I ₃₂ 3-7	223 - 227
SKUPINA 3	I ₃₂ 1-12, I ₃₂ 2-4, I ₃₂ 2-7, I ₃₂ 2-5	235 - 243
SKUPINA 4	I ₃₂ 1-6, I ₃₂ 1-7, I ₃₂ 1-8, I ₃₂ 1-9, I ₃₂ 3-2, I ₃₂ 3-3	249 – 253 in 274 - 277
SKUPINA 5	I ₃₂ 2-9	Najmočnejši pri 100
	I ₃₂ 2-10	220, 251 in 485
	I ₃₂ 3-4	/
	I ₃₂ 3-6	/
	I ₃₂ 3-9	208, 630, 703, 775, 897 in 1126

Elektroferogrami na Sliki 6 prikazujejo dolžine pomnožkov. Na sliki 6A I in predvsem na sliki 6A II (povečan del slike 6A I) so lepo vidne razlike v dolžini posameznih pomnožkov. Pri izolatu I₃₂1-6 sta vidna dva različno močna vrhova (pika), kar bi lahko pomenilo, da je prisotnih več različnih operonov za 16S rRNK z dvema različnima sekvencama. Slika 6B prikazuje primerjavo dolžine pomnožkov, ki smo jih uvrstili v skupino 5. Pri posameznih izolatih je prisotnih več različno dolgih pomnožkov (I₃₂2-9, I₃₂2-10 in I₃₂3-9). Pri vzorcih I₃₂3-4 in I₃₂3-6 pa količina DNK ni bila dovolj velika, da bi jo bioanalizator zaznal.



Slika 6: Elektroferogram pomnožkov izolatov iz priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32: **A)** I in II primerjava 5 vzorcev, po en iz vsake skupine; **B)** primerjava vzorcev, ki jih uvrstiti v peto skupino.

4.5 DENATURACIJSKA GRADIENTNA GELSKA ELEKTROFOREZA (DGGE)

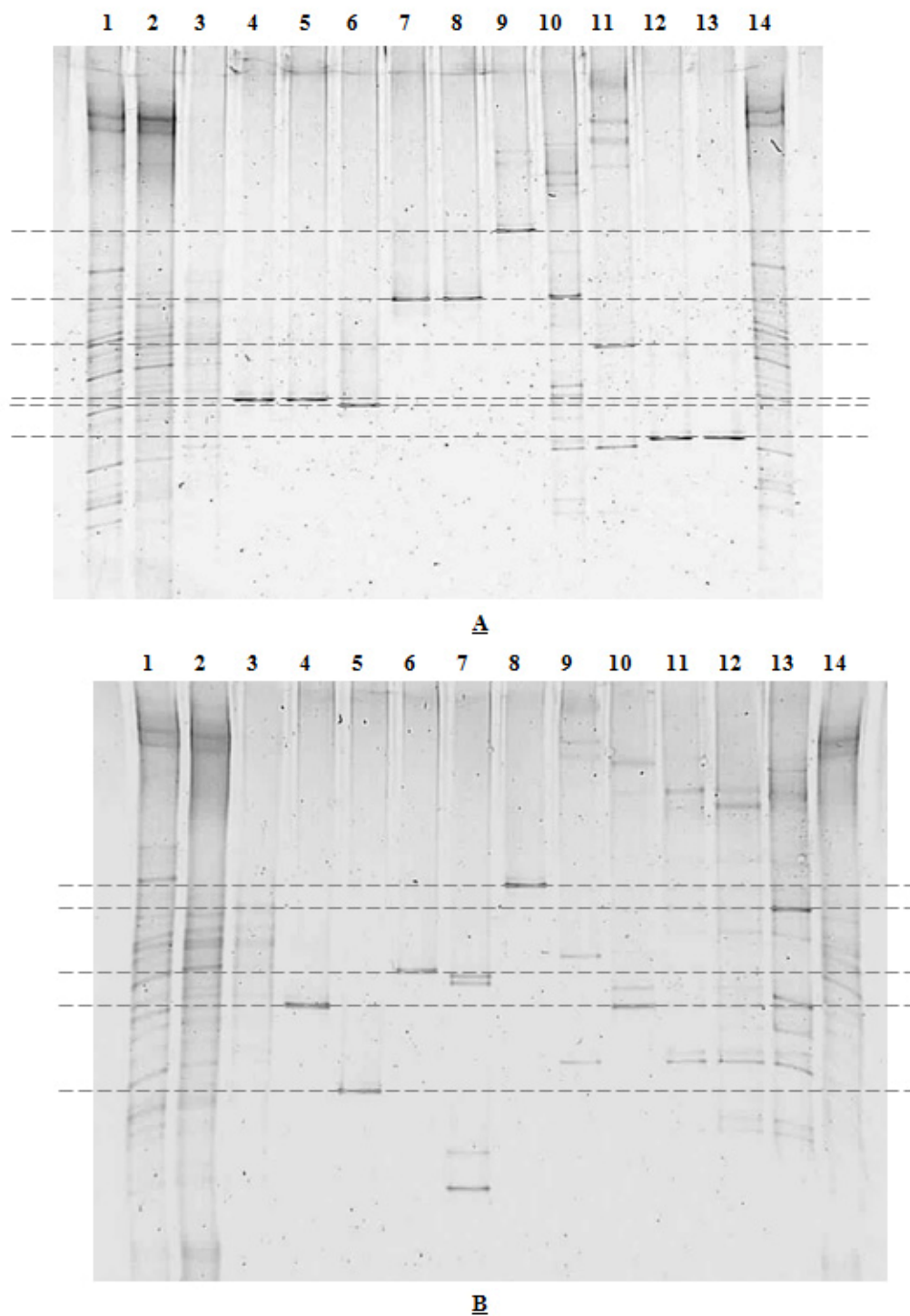
DGGE smo izvedli zato, da bi ugotovili ali lahko izolate uvrstimo v skupine tudi glede na DGGE profile in ali so pomnožki PCR posameznih izolatov ustavijo na enakih mestih kot posamezni pomnožki v DGGE profilu iz sedimentnih vzorcev.

Ugotovili smo, da so DGGE profili nekaterih izolatov enaki. Vsi izolati, ki smo jih glede na analizo dolžine PCR pomnožkov uvrstili v skupino 4 (**Preglednica 8**), imajo enak DGGE profil. Enak DGGE profil imajo tudi izolati I₃₂1-2, I₃₂1-5 (ni prikazano) in I₃₂1-11, pa tudi izolata I₃₂3-7 in I₃₂3-5 in izolata I₃₂2-1 in I₃₂2-2. Med seboj sta si podobna tudi DGGE profila izolatov I₃₂3-4 in I₃₂3-6. Kljub temu, da je na gelu prisotno veliko število različnih pomnožkov, sta najmočnejša pasova teh dveh izolatov prepotovala enako razdaljo, zato ju med seboj lahko primerjamo.

Slika 7 prikazuje DGGE profil pomnoženih genov za 16S rRNK, izoliranih iz čistih kultur ali direktno iz sedimenta, vendar pa DGGE profili vseh izolatov na tej sliki niso prikazani. Izolati, katerih pomnožki so na gelu prepotovali enako dolgo pot, imajo enak DGGE profil. To pomeni enako temperaturo denaturacije in morda enako sekvenco pomnožka. Če so bili na predhodnih DGGE gelih profili izolatov nedvoumno enaki, je bil tokrat na gel naložen samo eden od njih.

Enake DGGE profile imajo izolati:

- DGGE tip A1: I₃₂1-2, I₃₂1-5 (ni prikazano) in I₃₂1-11 iz skupine 1 in I₃₂3-4 iz skupine 5
- DGGE tip A2: I₃₂2-1 in I₃₂2-2 iz skupine 1
- DGGE tip B1: I₃₂3-5 in I₃₂3-7 iz skupine 2
- DGGE tip B2: I₃₂3-6 in I₃₂3-9 iz skupine 5
- DGGE tip C: I₃₂1-6, I₃₂1-7, I₃₂1-8, I₃₂1-9, I₃₂3-2 in I₃₂3-3 (na sliki prikazan samo pomnožek I₃₂1-6) iz skupine 4



B

Slika 7: Ločitev pomnožkov izolatov iz priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32 z denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo, optimizirana količina nanešenega vzorca.

A) Od leve proti desni si sledijo: **1** – A, **2** – B, **3** – C, **4** – I₃₂1-2, **5** – I₃₂1-11, **6** – I₃₂1-10, **7** – I₃₂2-1, **8** – I₃₂2-2, **9** – I₃₂2-8, **10** – I₃₂2-10, **11** – I₃₂1-6, **12** – I₃₂3-5, **13** – I₃₂3-7, **14** – A.

B) Od leve proti desni si sledijo: **1** – A, **2** – B, **3** – C, **4** – I₃₂1-2, **5** – I₃₂1-12, **6** – I₃₂2-4, **7** – I₃₂2-7, **8** – I₃₂2-5, **9** – I₃₂2-9, **10** – I₃₂3-4, **11** – I₃₂3-6, **12** – I₃₂3-9, **13** – I₃₂2-10, **14** – B

DGGE profile pomnožkov posameznih izolatov smo primerjali z DGGE profilom pomnožkov iz sedimentnih vzorcev in poskusili ugotoviti, kateri izolati dajo pomnožek, podoben kateremu od pomnožkov iz sedimentnih vzorcev. Na gelu A je v sedimentnem vzorcu A prisoten pomnožek, ki je prepotoval enako pot kot pomnožka izolatov I₃₂1-2 in I₃₂1-11, enako pot je prepotoval tudi pomnožek izolata I₃₂3-4 na gelu B. Pot pomnožka izolata I₃₂2-4 na gelu B ustreza prepotovani poti pomnožkov iz sedimentnih vzorcev A in B. Pomnožki izolatov I₃₂2-9, I₃₂3-6, I₃₂3-9 in I₃₂2-10 so se ustavili na enakem mestu v gelu B kot eden od pomnožkov iz sedimentnega vzorca A. Vendar pa so vzorci v gelih potovali na robovih gela hitreje kot v sredini, zato ugotovitve niso najbolj verodostojne in bi bilo potrebno ta del poskusa ponoviti.

4.6 POMNOŽEVANJE CELOTNE 16S rDNK ZA SEKVENCIRANJE

Za pomnoževanje genov za 16S rRNK iz DNK izolirane iz sedimentnih izolatov smo uporabili dva para začetnih oligonukleotidov: fD1/ 1392RU in Eub338f /1392RU. Po pomnoževanju, kadar je bilo uspešno, smo pogosto odkrili tudi nespecifične produkte pomnoževanja. Pomnožke pričakovane velikosti (1500 bp) smo zato izrezali iz gela in očistili, nato pa smo jih še enkrat pomnožili v verižni reakciji s polimerazo. Uporabili smo isti par začetnih oligonukleotidov kot pri prvem pomnoževanju. Rezultati so prikazani v **Preglednici 9**. Za sekvenciranje smo izbrali izolate glede na analizo dolžine PCR pomnožkov. Za sekvenciranje smo na podlagi razdelitve v **Preglednici 8** (str. 34) izbrali DNK vseh izolatov iz četrte skupine, po en izolat iz prve in druge skupine, dva izolata iz tretje skupine in vse izolate, ki smo jih uvrstili v peto skupino.

Za sekvenciranje smo pripravili pomnoženo 16S rDNK desetih izolatov. Pri enem izolatu (I₃₂3-5) je bil PCR po čiščenju PCR produktov iz gela neuspešen. Pri štirih izolatih (I₃₂2-10, I₃₂3-4, I₃₂3-6, I₃₂3-9) smo po sekundarnem pomnoževanju ponovno odkrili pomnožke vsaj dveh različnih velikosti, ponovnega čiščenja iz gela in pomnoževanja pa nismo ponovili. Izolatov, pri katerih nismo dobili enega samega pomnožka s pričakovano velikostjo, nismo sekvencirali.

Preglednica 9: Uspešnost pomnoževanja gena za 16S rRNK z različnimi pari začetnih oligonukleotidov.

Vzorec	fD1/1392RU	Eub338f/1392RU	Sekundarni PCR	Sekvenciranje
I ₃₂ 1-2	+	-	+	+
I ₃₂ 1-6	+	-	+	+
I ₃₂ 1-7	+	-	+	+
I ₃₂ 1-8	+	-	+	+
I ₃₂ 1-9	+	-	+	+
I ₃₂ 1-12	+	-	+	+
I ₃₂ 2-5	+	-	+	+
I ₃₂ 2-9	+	-	+	+
I ₃₂ 2-10	-	+	2 pomnožka	/
I ₃₂ 3-2	+	-	+	+
I ₃₂ 3-3	+	-	+	+
I ₃₂ 3-4	-	+	2 pomnožka	/
I ₃₂ 3-5	+	-	-	/
I ₃₂ 3-6	-	+	2 pomnožka	/
I ₃₂ 3-9	-	+	2 pomnožka	/

Pri pomnoževanju celotne 16S rDNK smo pri vseh izolatih iz skupine 4 dobili dva različno dolga pomnožka. Pred nadaljnjo obdelavo smo iz gela izrezali najmanjši pomnožek, ga očistili in ponovno pomnožili. Prav tako smo pri pomnoževanju dela gena za 16S rRNK dobili dva različna pomnožka. Poiskali smo prijemališča začetnih oligonukleotidov F338gc in 581R znotraj pridobljene sekvence, saj bi lahko obstajalo dodatno prijemališče za enega od začetnih oligonukleotidov, vendar ga nismo našli (**Priloga 1**). Predvidevamo, da je pri izolatih iz skupine 4 prisotnih več različnih operonov gena za 16S rRNK, pridobili pa smo sekvenco le enega od njih.

4.7 TAKSONOMSKA UVRSTITEV IZOLATOV GLEDE NA SEKVENCE 16S

rDNK

Pridobljene sekvence (**Priloga 1**) smo najprej pregledali in na obeh koncih odrezali neidentificirane nukleotide. Od desetih pridobljenih sekvenc so bile štiri slabe kvalitete (I₃₂1-2, I₃₂2-9, I₃₂1-12 in I₃₂2-5). Sekvence smo po podrobnem pregledu sekvenčnih kromatogramov ročno popravili in jih nato preliminarno taksonomsko uvrstili z orodjem Classifier v bazi podatkov RDP II.9 (Cole in sod, 2005). V **Preglednici 10** je prikazana uvrstitev sekvenc glede na to bazo podatkov. Nato smo poiskali najbolj podobne sekvence še v bazah podatkov NCBI (National Center for Biotechnology Information) in EBI (European Bioinformatics Institute).

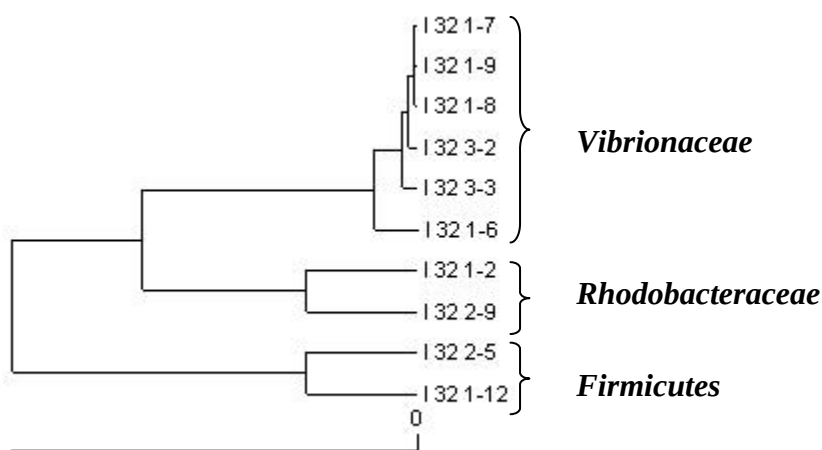
Preglednica 10: Uvrstitev sekvenc glede na bazo podatkov RDP II.9 (Cole in sod., 2005) z orodjem Classifier; v oklepajih so prikazani odstotki podobnosti.

Sekvenca	Debilo	Razred	Red	Družina	Rod
I₃₂1-6 (Skupina 4)	Proteobakterije [100%]	γ -proteobakterije [100%]	<i>Vibrionales</i> [100%]	<i>Vibrionaceae</i> [100%]	<i>Listonella</i> [86%]
I₃₂1-7 (Skupina 4)	Proteobakterije [100%]	γ -proteobakterije [100%]	<i>Vibrionales</i> [100%]	<i>Vibrionaceae</i> [100%]	<i>Vibrio</i> [56%]
I₃₂1-8 (Skupina 4)	Proteobakterije [100%]	γ -proteobakterije [100%]	<i>Vibrionales</i> [100%]	<i>Vibrionaceae</i> [100%]	<i>Vibrio</i> [82%]
I₃₂1-9 (Skupina 4)	Proteobakterije [100%]	γ -proteobakterije [100%]	<i>Vibrionales</i> [100%]	<i>Vibrionaceae</i> [100%]	<i>Vibrio</i> [90%]
I₃₂3-2 (Skupina 4)	Proteobakterije [100%]	γ -proteobakterije [100%]	<i>Vibrionales</i> [100%]	<i>Vibrionaceae</i> [100%]	<i>Listonella</i> [98%]
I₃₂3-3 (Skupina 4)	Proteobakterije [100%]	γ -proteobakterije [100%]	<i>Vibrionales</i> [100%]	<i>Vibrionaceae</i> [100%]	<i>Listonella</i> [100%]
I₃₂1-2 (Skupina 1)	Proteobakterije [98%]	α -proteobakterije [95%]	<i>Rhodobacterales</i> [94%]	<i>Rhodobacteraceae</i> [94%]	<i>Leisingera</i> [46%]
I₃₂2-9 (Skupina 5)	Proteobakterije [80%]	α -proteobakterije [69%]	<i>Rhodobacterales</i> [60%]	<i>Rhodobacteraceae</i> [60%]	<i>Leisingera</i> [18%]
I₃₂1-12 (Skupina 3)	<i>Firmicutes</i> [34%]	<i>Bacilli</i> [19%]	<i>Bacillales</i> [12%]	<i>Paenibacillaceae</i> [7%]	<i>Thermicanus</i> [7%]
I₃₂2-5 (Skupina 3)	<i>Firmicutes</i> [26%]	<i>Clostridia</i> [24%]	<i>Clostridiales</i> [18%]	<i>Peptococcaceae</i> [4%]	<i>Cryptanaerobacter</i> [4%]

Izolate smo lahko do ravni družine tudi po iskanju podobnih sekvenc z orodji BLAST in FASTA v bazah podatkov NCBI in EBI uvrstili podobno kot glede na rezultate analize v bazi podatkov RDP II.9 z orodjem Classifier. Na nižjih taksonomskih nivojih je prišlo do nekaterih neskladnosti, ki pa so bolj posledica nedorečenosti taksonomskega sistema kot razlik v rezultatih iskanja z različnimi orodji. Vsi izolati iz skupine 4 so se s 100% zanesljivostjo uvrstili v družino *Vibrionaceae*. Znotraj le te so se uvrstili v rodova *Listonella* oz. *Vibrio*. Izolat I₃₂1-2 iz prve skupine izolatov (DGGE A1) se je dokaj zanesljivo (94%) uvrstil v α -proteobakterijsko domeno *Rhodobacteraceae*. Tako kot tudi izolat I₃₂2-9, ki smo ga uvrstili v peto skupino. Izolata I₃₂1-12 in I₃₂2-5 iz tretje skupine pa sta se uvrstila med po Gramu pozitivne firmikute, a le z nizkim odstotkom zanesljivosti. Sekvenca izolata I₃₂1-12 je glede na bazo podatkov NCBI najbolj podobna sekvencam iz reda *Lactobacillales* (rod *Enterococcus* oziroma *Lactococcus*). Ko smo pregledovali rezultate v bazi podatkov EBI, smo opazili, da se pri sekvencah I₃₂1-2, I₃₂1-12, I₃₂2-5 in I₃₂2-9 z najbolj podobnimi sekvencami prekriva le približno polovica naše sekvence. Pri

tem je potrebno poudariti, da so najbolj podobne sekvence samo delne sekvence 16S rRNK genov.

Ugotovili smo torej, da lahko na osnovi enostavne primerjave podobnosti sekvenc 16S rDNK 10 izolatov uvrstimo v tri precej različne taksonomske skupine, kar prikazuje preliminarno filogenetsko drevo na **Sliki 8**. Najboljše sekvence smo dobili za izolate, ki sodijo v družino *Vibrionaceae* (6 sekvenc). Preostale 4 sekvence so bile slabše. Zaradi velikega števila neidentificiranih nukleotidov je taksonomska uvrstitev teh sekvenc nezanesljiva.



Slika 8: Filogenetsko drevo za 10 pridobljenih sekvenc (neobtežena metoda parnih skupin z aritmetično sredino – UPGMA).

Za posamezne skupine (*Vibrionaceae*, *Rhodobacteraceae* in *Bacillales*) smo iz baz podatkov NCBI in EBI in glede na taksonomski sistem, predstavljen v Bergeyevem priročniku za sistematsko bakteriologijo (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd. ed., 2004) izbrali sekvence najbolj sorodnih vrst in jih analizirali s programi, ki so vključeni programski paket MEGA 4.0 (Kumar in sod., 2004). V **Prilogi 3** so navedene izračunane distance med preučeni sekvencami.

4.7.1 *Vibrionaceae*

Po Bergeyevem priročniku za sistematsko bakteriologijo (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd. ed., 2005) je v družino *Vibrionaceae* uvrščenih 8 rodov: *Allomonas* (1 vrsta), *Catenococcus* (1 vrsta), *Enterovibrio* (1 vrsta), *Grimontia* (1 vrsta), *Listonella* (2 vrsti), *Photobacterium* (7 vrst), *Salinivibrio* (1 vrsta) in *Vibrio* (51 vrst) (Thompson in sod., 2004). Tipični rod je *Vibrio*, tipična vrsta rodu pa je *Vibrio cholerae*, ki, razen *Vibrio mimicus*, nima bližnjih sorodnikov. Ti dve vrsti se uvrščata v posebno skupino.

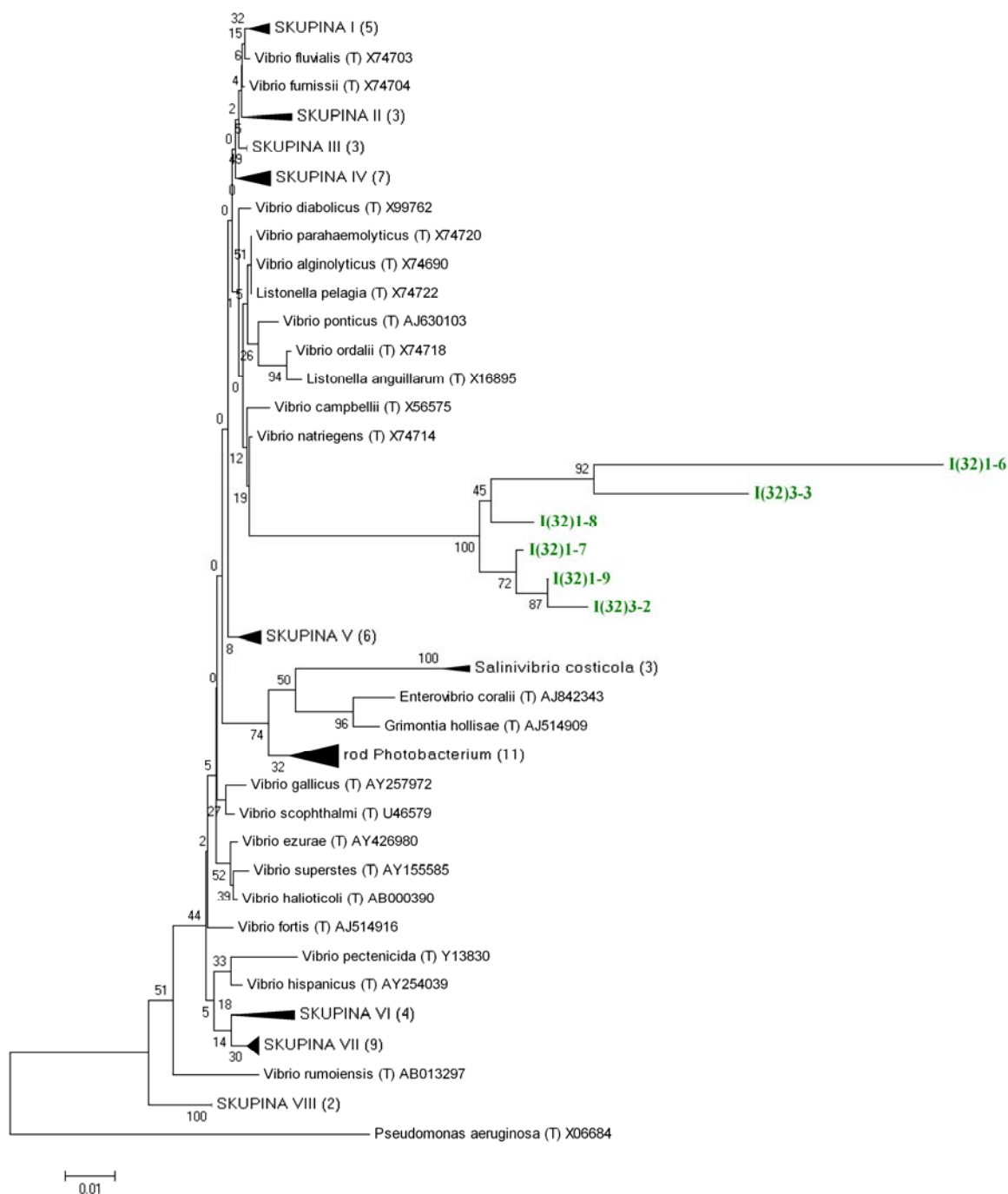
Vibriji sodijo med γ -proteobakterije in so po Gramu negativne gibljive palčke. Večina vibrijev so mezofilni kemoorganotrofi in za njih je značilna fakultativna fermentativna presnova. Vibriji so razširjeni v vodnih okoljih, kjer so lahko prosto živeči, živijo v simbiozi z višjimi organizmi ali pa so za njih patogeni. Imajo tudi sposobnost zaznavanja celične gostote. *V. cholerae* in *V. mimicus* sta pomembna patogena, ki pri človeku povzročata kolero oziroma diarejo.

Z orodjem Classifier (RDP II) smo sekvence treh izolatov iz četrte skupine (I₃₂₁-7, I₃₂₁-8, I₃₂₁-9) uvrstili v rod *Vibrio*, drugih treh iz te skupine (I₃₂₁-6, I₃₂₃-2, I₃₂₃-3) pa v rod *Listonella*. Filogenetska analiza pa je pokazala, da vseh 6 izolatov sodi v eno samo monofiletsko skupino, katere najbližja sorodnika sta tipična seva vrst *Vibrio natrieensis* in *Vibrio campbelli*. Zaradi dokaj slabih sekvenc so »bootstrap« vrednosti, ki omenjeno skupino povezujejo z *V. natrieensis* in *V. campbelli* dokaj nizke. Kljub temu ni dvoma, da gre za prave vibrije iz rodu *Vibrio*. Ali predstavljajo izolati iz podvodnega izvira Izola 32 novo vrsto iz tega rodu, pa na podlagi dosedanjih analiz še ne moremo zagotoviti.

V **Preglednici 11** je prikazano, katere sekvence smo na filogenetskem drevesu uvrstili v posamezne skupine od I do VIII. Posamezne skupine sekvenc smo poimenovali kot neformalne skupine, da bi povečali preglednost filogenetskega drevesa in ne odražajo trenutno veljavnega taksonomskega sistema.

Preglednica 11: Razvrstitev sekvenc po posameznih skupinah

SKUPINA I	<i>V. nereis</i> , <i>V. xuii</i> , <i>V. tubiashii</i> , <i>V. hepatarius</i> , <i>V. coralliilyticus</i>
SKUPINA II	<i>V. nigripulchritudo</i> , <i>V. gazogenes</i> , <i>V. ruber</i>
SKUPINA III	<i>V. neptunius</i> , <i>V. brasiliensis</i> , <i>Allomonas enterica</i>
SKUPINA IV	<i>V. diazotrophicus</i> , <i>V. navarrensis</i> , <i>V. proteolyticus</i> , <i>V. cincinnatiensis</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. metschinkovii</i> , <i>V. vulfinicus</i>
SKUPINA V	<i>V. shilonii</i> , <i>V. orientalis</i> , <i>V. pacinii</i> , <i>V. aestuarianus</i> , <i>V. mediterranei</i> , <i>V. tapetis</i>
SKUPINA VI	<i>V. fischeri</i> , <i>V. wodanis</i> , <i>V. salmonicida</i> , <i>V. agarivorans</i>
SKUPINA VII	<i>V. kanaloae</i> , <i>V. gigantis</i> , <i>V. pomeroyi</i> , <i>V. crassostreae</i> , <i>V. chagasii</i> , <i>V. splendidus</i> , <i>V. tasmaniensis</i> , <i>V. lentus</i> , <i>V. cyclitrophicus</i>
SKUPINA VIII	<i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i>



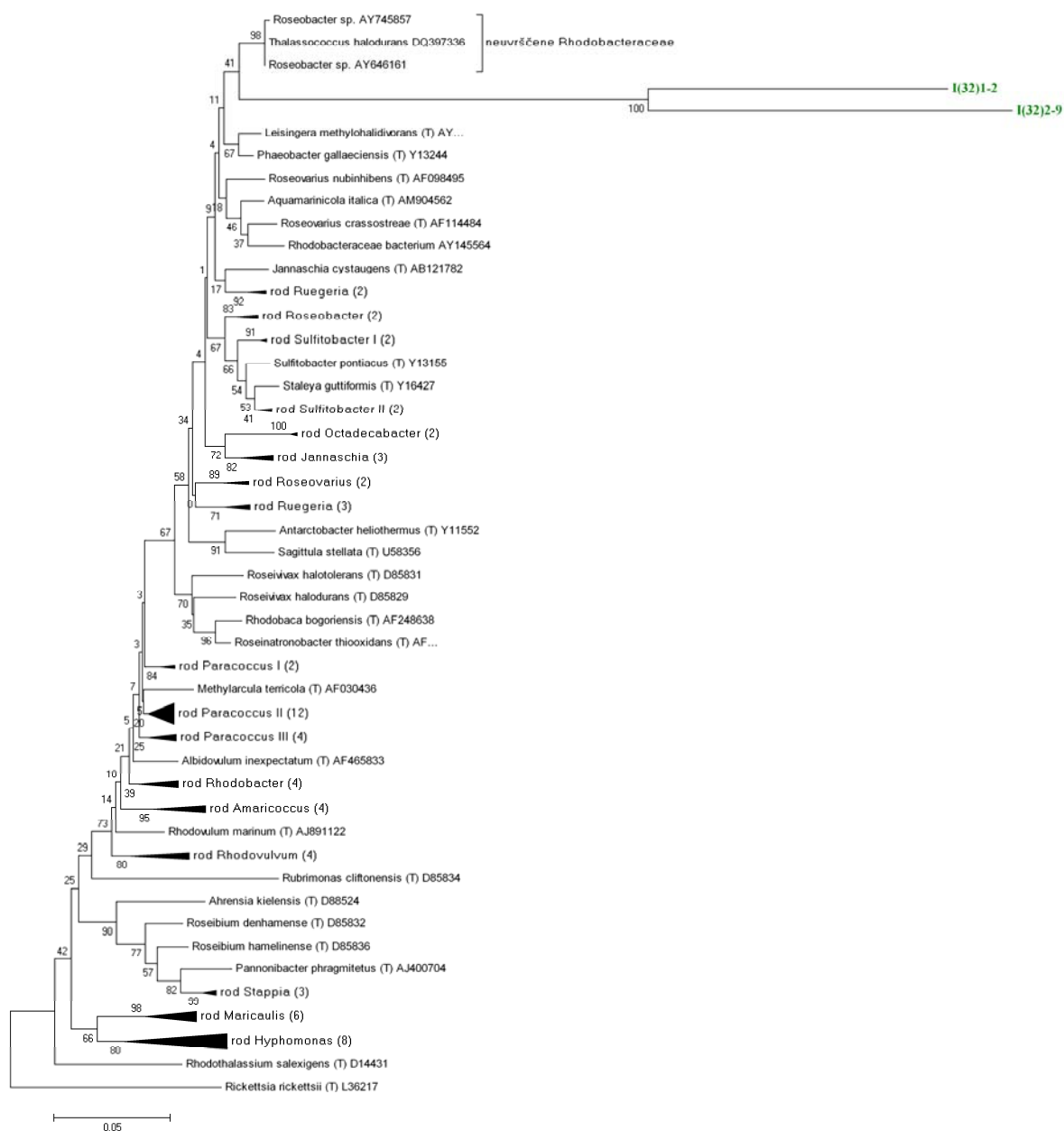
Slika 9: Uvrstitev izolatov I₃₂1-6, I₃₂1-7, I₃₂1-8, I₃₂1-9, I₃₂3-2 in I₃₂3-3 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa) družine *Vibrionaceae*, narejeno s programskim paketom MEGA 4. Na razvejiščih je odstotek verjetnosti razvejitve. Številke v oklepajih predstavljajo število sekvenc.

4.7.2 *Rhodobacteraceae*

Družina *Rhodobacteraceae* vključuje rodove *Rhodobacter* (tipski rod), *Ahrensia*, *Albidovulum*, *Amaricoccus*, *Antarctobacter*, *Gemmobacter*, *Hirschia*, *Hyphomonas*, *Jannaschia*, *Ketogulonicigenium*, *Leisingera*, *Maricaulis*, *Methylococcus*, *Octadecabacter*, *Pannonibacter*, *Paracoccus*, *Pseudorhodobacter*, *Rhodobaca*, *Rhodothalassium*, *Rhodovulum*, *Roseibium*, *Roseinatronobacter*, *Roseivivax*, *Roseobacter*, *Roseovarius*, *Rubrimonas*, *Ruegeria*, *Sagittula*, *Staleyia*, *Stappia* in *Sulfitobacter* (Garrity in sod., 2005).

Ta družina je fenotipsko, presnovno in ekološko zelo raznolika. Vključuje fotoheterotrofe, ki v primernih razmerah v okolju lahko rastejo fotoautotrofno ali kemotrofno, kemoorganotrofe z obema, tako s striktno aerobno kot s fakultativno anaerobno respiratorno presnovo, fakultativno fermentativne organizme in fakultativne metilotrofe. Mnogi so vodni organizmi. Mnogi za rast potrebujejo NaCl (Garrity in sod., 2005).

V sekvencah izolatov I₃₂₁-2 in I₃₂₂-9 je veliko neidentificiranih nukleotidov in tudi med seboj sta si sekvenci precej različni. Izolata se uvrščata v lastno skupino (**Slika 10**), najbližje pa so jima sekvence organizmov, ki se v družini *Rhodobacteraceae* ne uvrščajo v nobenega od do sedaj opisanih rodov. Od izoliranih organizmov jima je najbližje vrsta *Thalassococcus halodurans*. To so striktno aerobne in močno halotolerantne bakterije, ki tvorijo nepigmentirane jajčaste celice, izolirali pa so jih iz površine morske spužve *Halichondria panicea* (Lee in sod. 2007). Natančneje najbližjih sorodnikov izolatov I₃₂₁-2 in I₃₂₂-9 ne moremo določiti, lahko pa s precejšnjo gotovostjo rečemo, da vsaj izolat I₃₂₁-2 zanesljivo sodi v družino *Rhodobacteraceae*.

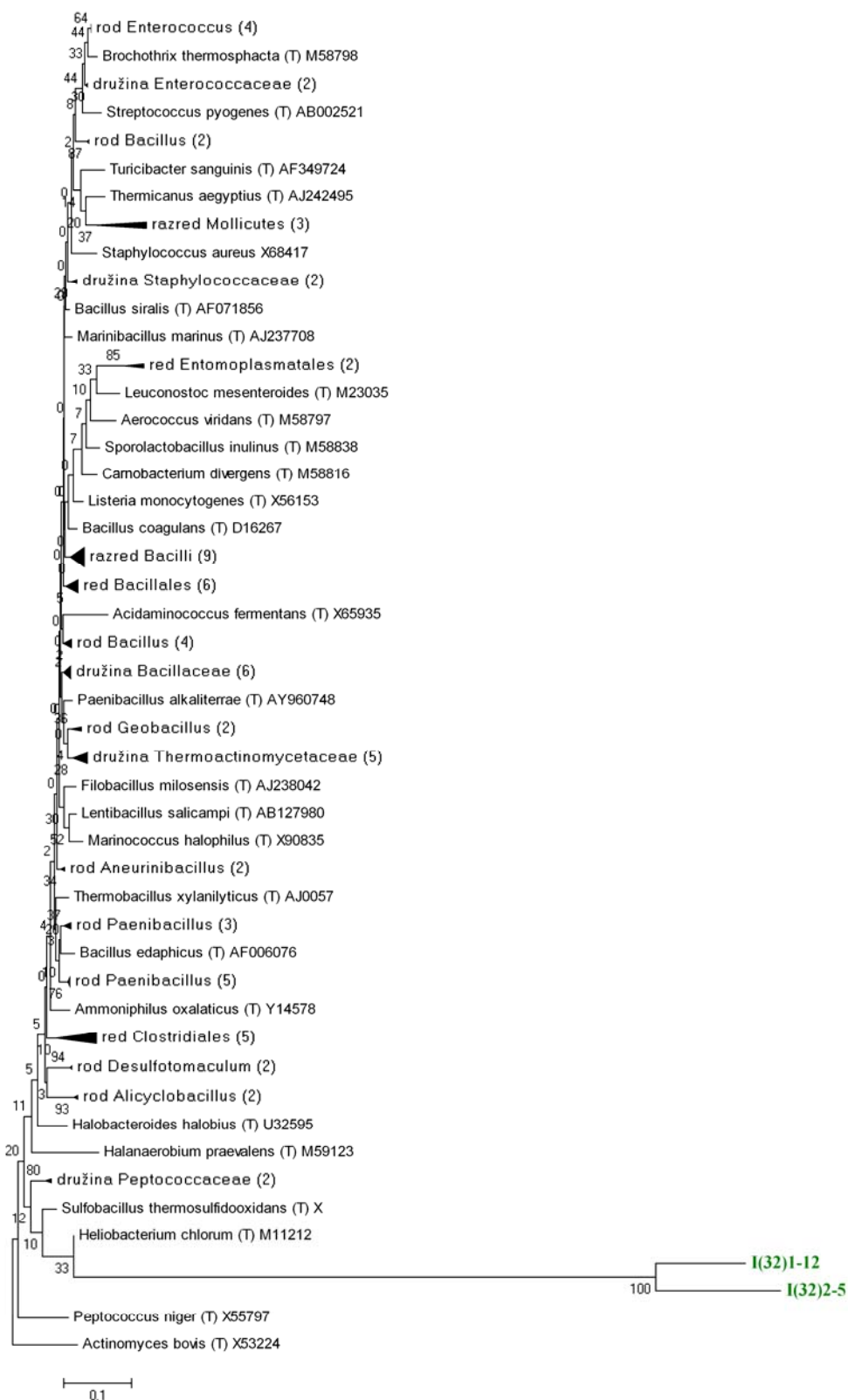


Slika 10: Uvrstitev izolatov I₃₂1-2 in I₃₂2-9 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa) reda *Rhodobacterales*, narejeno s programskim paketom MEGA 4.0. Številke v oklepajih predstavljajo število sekvenc.

4.7.3 *Firmicutes*

V deblo *Firmicutes* se uvrščajo razredi *Clostridia*, *Mollicutes* in *Bacilli*. V razred *Clostridia* sodijo trije redovi: *Clostridiales*, *Thermoanaerobacteriales* in *Halanaerobiales*. V razred *Mollicutes* sodijo redovi *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales* in *Acholeplasmatales*. V razred *Bacilli* pa se uvrščata redova *Bacillales* in *Lactobacillales* (Brenner in sod. 2005). Vse vrste, ki sodijo med firmikute, se barvajo po Gramu pozitivno in imajo nizko vsebnost GC baznih parov.

Sekvenco izolata I₃₂1-12 smo z orodjem Classifier uvrstili v red *Bacillales*, sekvenco izolata I₃₂2-5 pa v red *Clostridiales*. V sekvencah je veliko neidentificiranih nukleotidov, predvsem sekvenca I₃₂2-5 je zelo slabe kakovosti. To je onemogočilo bolj natančno uvrstitev, saj sta se sekvenci v filogenetskem drevesu uvrstili v ločeno, evolucijsko zelo globoko filogenetsko skupino (**Slika 11**). Dolžina veje pa v tem primeru precej gotovo ne odseva evolucijske razdalje, temveč je posledica slabe sekvence.



Slika 11: Uvrstitev izolatov I₃₂1-12 in I₃₂2-5 v filogenetsko drevo (metoda sosedskega odnosa) debla *Firmicutes*, narejeno s programskim paketom MEGA 4.0

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

S kombiniranim pristopom, v katerem smo uporabili tako neposredne molekularne metode kot tradicionalne mikrobiološke metode, ki temeljijo na izolaciji in gojenju mikroorganizmov, smo skušali analizirati strukturo mikrobne združbe sedimentov v priobalnem sladkovodnem izviru Izola 32 v Jadranskem morju ter tako opisati pestrost dela sedimentne mikrobiote, ki jo lahko gojimo v laboratorijskih razmerah.

Sediment smo vzorčili v juniju leta 2006 in vzorce nacepili na tri agarizirana gojišča, katerih osnova je bil morski agar. Ker gre za morske sedimentne vzorce iz sladkovodnega izvira, v katerih prihaja do mešanja sladke in morske vode, je slanost vode, ki sediment nadslojuje, okrog 5‰. Koncentracije Na, K, Mg in Sr so v izvirski vodi približno desetkrat manjše kot v morski vodi. Izjema je Ca, saj je raztapljanje kalcita v izvirski vodi termodinamsko ugodnejše. Izvirska voda vsebuje tudi precej sulfida (Faganeli in sod., 2005). Zato smo pri našem delu uporabili običajno trdno gojišče z morskim agarjem in 10× redčeno gojišče z morskim agarjem, v katerem so bile razmere bolj podobne izvirskim. V tretji vrsti gojišča smo kot sredstvo za strjevanje namesto agarja uporabili gelanski gumi, saj agar na nekatere skupine mikroorganizmov lahko deluje toksično (Janssen in sod. 2002), nekateri mikroorganizmi pa agar lahko razgradijo (Akagawa-Matsushita in sod., 1992). Izbrali smo po deset sevov, ki so zrasli na posameznem gojišču, in jih precepljali do čiste kulture. Med postopkom čiščenja smo 6 sevov izgubili.

Na podlagi morfološkega opisa celic oziroma kolonij smo izolate uvrstili v nekaj skupin. Predvsem velika je bila makromorfološka pestrost, ki se je najbolj odražala v obarvanosti zraslih kolonij.

Uspešno smo izolirali celotno genomsko DNK iz vseh izolatov. Količina izolirane DNK iz nekaterih vzorcev je bila tako majhna, da smo jo na gelu komaj opazili, vendar je zadostovalo za uspešno pomnoževanje genov za 16S rRNK v verižni reakciji s polimerazo.

Glavnina dela je temeljila na genotipski karakterizaciji izolatov. Na začetku dela smo se odločili za tipizacijo na podlagi podobnosti profilov denaturacijske gradientne gelske elektroforeze (DGGE) v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnoženih genov za 16S rRNK. Za pomnoževanje smo najprej uporabili začetna oligonukleotida F698gc in 1401R, vendar po izvedeni PCR pri skoraj tretjini izolatov pričakovanih produktov nismo odkrili. Zato smo zamenjali par začetnih oligonukleotidov in program PCR. Z začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R smo s PCR pomnožili dele genov za 16S rRNK iz vseh 24 izolatov, prav tako pa tudi dele genov za 16S rRNK iz DNK, izolirane direktno iz sedimenta.

Pri pomnoževanju genov za 16S rRNK iz posameznih izolatov smo pričakovali pomnožke, dolge približno 250 baznih parov (bp). Po pregledu rezultatov elektroforetske ločitve pomnožkov smo ugotovili, da so pomnožki v povprečju sicer res dolgi približno 250 bp, vendar se po dolžini med seboj precej razlikujejo (**Slika 4C**). Pri pomnoževanju genov za 16S rRNK iz nekaterih izolatov so nastali tudi nespecifični pomnožki. Točno dolžino pomnožkov smo nato določili z bioanalizatorjem Agilent 2100. Rezultati so potrdili prejšnje ugotovitve, pomnožki so bili dolgi od 213 do 277 bp.

Ker bi bilo za optimalno analizo z DGGE najbolje, da bi bili vsi pomnožki enako dolgi, smo težavo najprej poskušali odpraviti z optimizacijo PCR. Težava bi namreč lahko nastajala zaradi nespecifičnega prileganja začetnih oligonukleotidov. Zato smo najprej uporabili gradientno verižno reakcijo s polimerazo, pri čemer nas je zanimal vpliv koncentracije matrične DNK in temperature prileganja začetnih oligonukleotidov na dolžino pomnožka. Ne glede na različne temperature prileganja začetnih oligonukleotidov in na redčitev izolirane mikrobne DNK smo pri pomnoževanju genov za 16S rRNK vedno dobili različno dolge pomnožke. Ta fenomen je opisal že Suzuki s sod. (1998), ko je uvedel novo molekularno tipizacijsko metodo LH-PCR (length heterogeneity analysis), ki različne organizme opredeljuje glede na naravne variacije v dolžini 16S rDNK. Ugotovili so, da se nekatere regije v genih za 16S rRNK pri različnih filogenetskih skupinah bakterij med seboj razlikujejo, saj v teh regijah prihaja do pogostejših insercij ali delecij, posledično pa se te regije razlikujejo tudi po dolžini.

Izolate smo glede na dolžino pomnožkov delov genov za 16S rRNK razvrstili v 5 skupin. Pri tem so peto skupino predstavljali izolati, ki si niso bili podobni in jih tudi nismo mogli uvrstiti v preostale štiri skupine. Izolate, ki smo jih uvrstili v določeno skupino, smo nato med seboj primerjali tudi glede na makromorfološki in mikromorfološki opis ter glede na DGGE profil. Pri izbranih izolatih smo želeli ugotoviti tudi sekvence genov za 16S rRNK, zato smo celotno 16S rDNK pomnožili v reakciji PCR, pomnožke izrezali iz gela in očistili, nato pa ponovno pomnožili z istim parom začetnih oligonukleotidov. Zadostno količino 16S rDNK smo poslali sekvencirat firmi MacroGen (Koreja, macrogen.com). Pridobljene sekvence smo ročno popravili, nato pa smo jih preliminarno taksonomsko uvrstili z orodjem Classifier v bazi podatkov RDP II.9 (Cole in sod, 2005).

Šest izolatov, uvrščenih v skupino 1 (I₃₂1-2, I₃₂1-5, I₃₂1-10, I₃₂1-11, I₃₂2-1 in I₃₂2-2), se barva po Gramu negativno, vsi imajo majhne okrogle celice, pri pomnoževanju v verižni reakciji s polimerazo pa smo pri vseh dobili enako dolg pomnožek. Med seboj se razlikujejo glede na pigmentiranost kolonij. Izolati I₃₂1-2, I₃₂1-5 (ni prikazano) in I₃₂1-11 imajo enak DGGE profil (A1), enak profil imata tudi izolata I₃₂2-1 in I₃₂2-2 (A2). Ker smo s filogenetsko analizo ribosomskih sekvenc ugotovili, da izolat I₃₂1-2 sodi v družino *Rhodobacteraceae*, verjetno v isto družino sodita tudi izolata I₃₂1-5 in I₃₂1-11. Kam sodita izolata I₃₂2-1 in I₃₂2-2, ki imata tudi enak DGGE profil, ni jasno, ker nismo pridobili sekvence ribosomskih genov in jih tako nismo mogli taksonomsko uvrstiti.

V skupino 1 smo glede na dolžino pomnožka uvrstili tudi izolat I₃₂2-8, ki pa se v nasprotju z ostalimi izolati iz skupine barva po Gramu pozitivno in ima večje celice.

Glede na DGGE profil bi lahko v skupino 1 uvrstili tudi izolat I₃₂3-4, vendar se tudi ta barva po Gramu pozitivno, zrastle pa je kot edini iz te skupine na gojišču z gelanskim gumijem.

V drugo skupino smo uvrstili dva izolata (I₃₂3-5 in I₃₂3-7), ki sta si tudi mikromorfološko zelo podobna. Tudi DGGE profil je bil enak, zato smo sklepali, da sta izolata verjetno filogenetsko sorodna. Poskušali smo pridobiti tudi sekvenco 16S rDNK izolata I₃₂3-5,

vendar je bil sekundarni PCR po čiščenju pomnožkov primarnega PCR iz gela neuspešen. Teh dveh izolatov zato nismo uspeli taksonomsko uvrstiti.

Štirje izolati, uvrščeni glede na dolžino pomnožkov v skupino 3 (I₃₂1-12, I₃₂2-4, I₃₂2-5 in I₃₂2-7), se mikromorfološko in makromorfološko razlikujejo: izolat I₃₂2-4 je po Gramu negativna kokoidna bakterija, ostali trije izolati se barvajo po Gramu pozitivno. Različni so tudi njihovi DGGE profili. Izolatoma I₃₂1-12 in I₃₂2-5 smo ugotovili sekvenco genov za 16S rRNK in taksonomsko oba uvrstili v deblo *Firmicutes*. Sekvenca izolata I₃₂1-12 se v bazi podatkov RDP II.9 z orodjem Classifier uvršča v red *Bacillales*, I₃₂2-5 pa v red *Clostridiales*. V filogenetskem drevesu po metodi sosedskega odnosa se obe sekvenci uvrščata v samostojno skupino znotraj debla *Firmicutes*, najbližje pa jima je tipska vrsta *Heliobacterium chlorum*. Bolj natančna taksonomska uvrstitev ni bila mogoča, saj je bila v obeh primerih v sekvenca precej slaba in je vsebovala veliko nedoločenih nukleotidov.

V skupino 4 smo uvrstili šest izolatov, ki se vsi barvajo po Gramu negativno in so drobni koki. Vseh šest izolatov ima enak DGGE profil (ni prikazano). Sklepali smo, da so izolati morda filogenetsko sorodni. Njihovo filogenetsko sorodnost smo potrdili z ugotovitvijo sekvenc genov za 16S rRNK in taksonomsko uvrstitvijo v družino *Vibrionaceae*. Trije izolati (I₃₂1-6, I₃₂3-2 in I₃₂3-3) so se v bazi podatkov RDP II.9 z orodjem Classifier uvrstili v rod *Listonella*, trije izolati (I₃₂1-7, I₃₂1-8 in I₃₂1-9) pa so se uvrstili v rod *Vibrio*. Sekvence vseh šestih izolatov so se po podrobnejši filogenetski analizi uvrstile znotraj vibrijev v ločeno skupino, katere najbližja sorodnika sta tipski vrsti *V. natriegens* in *V. campbellii*.

Preostalih izolatov (skupina 5) glede na dolžino PCR pomnožka nismo mogli uvrstiti v opisane štiri skupine, saj je pri pomnoževanju genov za 16S rRNK nastalo več različno dolgih pomnožkov (I₃₂2-9, I₃₂2-10, I₃₂3-9) ali pa je bila količina pomnožene 16S rDNK premajhna, da bi jo bioanalizator zaznal (I₃₂3-4, I₃₂3-6). Izolati I₃₂2-10, I₃₂3-4, I₃₂3-6 in I₃₂3-9 so si mikromorfološko in makromorfološko med seboj zelo podobni: vsi se barvajo po Gramu pozitivno, imajo velike ovalne celice in tvorijo okrogle rožnato pigmentirane kolonije. Analiza DGGE pri teh štirih izolatih ni dala zadovoljivih rezultatov, saj je bilo zaradi velikega števila pomnožkov na gelu njihove DGGE profile med seboj težko

primerjati. Glavni pas izolata I₃₂3-4 je sicer na istem mestu kot tisti iz skupine A1, vendar pa se izolati iz te skupine barvajo po Gramu negativno. Neuspešen je bil tudi poskus ugotovitve sekvenc genov za 16S rRNK, tako da nam ni uspelo ugotoviti, ali so ti štirje izolati med seboj filogenetsko sorodni. Uspešno pa smo določili 16S rDNK sekvenco izolata I₃₂2-9 in ga taksonomsko uvrstili v družino *Rhodobacteraceae*. Izolat I₃₂2-9 je glede na taksonomsko uvrstitev sekvence filogenetsko soroden izolatu I₃₂1-2, ki smo ga uvrstili v skupino 1.

Tudi če smo pri analizi DGGE odkrili enak profil, še ne moremo trditi, da gre za enake sekvence. Za to bi morali potrditi identiteto DGGE pasov s sekvenciranjem, saj lahko različni tipi sekvenc migrirajo na isto mesto v gradientu. Dokler sekvenc v pasu ne preverimo, samo mesto v gradientu ni dovolj zanesljiva osnova za identifikacijo (Ferris in sod., 1996). To se je pri naši analizi DGGE lepo pokazalo pri sekvencah, ki smo jih uvrstili med vibrije. Vseh 6 sekvenc si je sicer med seboj podobnih, niso pa enake, čeprav je njihov DGGE profil enak.

DGGE profile čistih izolatov smo primerjali tudi z DGGE profili DNK, izolirane direktno iz sedimenta. Rezultati kažejo, da nam je uspelo zajeti le zelo majhen del celotne mikrobne združbe v sedimentu. Le nekaj DGGE pasov čistih kultur se je ustavilo na enakih mestih kot nekateri pomembnejši pasovi v DGGE profilih iz sedimentnih vzorcev. Kot pričakovano, smo z gojitvenim pristopom odkrili manj številčne predstavnike združbe morskih sedimentov v priobalnem morju severnega Jadrana.

5.2 SKLEPI

S kombinacijo dveh pristopov, tradicionalnih mikrobioloških metod in molekularnih metod, smo opisali le majhen del mikrobne združbe, kar dokazujejo primerjave med DGGE profili čistih kultur in kompleksnimi profili DGGE iz vzorcev sedimenta.

Na agariziranem gojišču na osnovi morskega agarja (približek morske vode) so v večjem številu zrasli po Gramu negativni mikroorganizmi, na trdnih gojiščih z 10× manjšo koncentracijo morskega agarja pa po Gramu pozitivni mikroorganizmi. Na redčenem gojišču in na gojišču z gelanskim gumijem so zrasli drugačni organizmi kot na gojišču z

morskim agarjem. Za bolj podroben vpogled v pestrost združbe bi morali uporabiti še druga gojišča, predvsem pa bi morali pregledati večje število izolatov na vsakem gojišču, kar pa je presegalo obseg diplomske naloge.

Večina izolatov, ki smo jih identificirali, sodi med vibrije, kar ni presenetljivo, saj so vibriji tipične morske bakterije. Bolj zanimivo je, da smo izolirali praviloma same koke, ki niso tipičen morfotip bakterij iz širše taksonomske skupine vibrijev.

Tako morfotaksonomski pristopi kot molekularni pristopi niso dovolj informativni za zanesljivo uvrščanje izolatov v skupine. Dokončno informacijo ponuja samo sekvenciranje molekularnih kronometrov (v našem primeru 16S rDNK). Tipizacijske tehnike se tako splača izkoriščati samo, če jih uspemo toliko optimirati, da so cenejše od sekvenciranja.

6 POVZETEK

Pri našem delu smo želeli preučiti pestrost mikrobne združbe v sedimentih jadranskega priobalnega sladkovodnega izvira Izola 32. Pri delu smo uporabili tako molekularne metode kot tradicionalne mikrobiološke metode, ki temeljijo na izolaciji in gojenju mikroorganizmov. Vzorce sedimenta smo nacepili na tri različna agarizirana gojišča, katerih osnova je bil morski agar. Gojišča so se med seboj razlikovala glede na koncentracijo morskega agarja (v prvem tipu gojišča samo morski agar, v drugem tipu gojišča smo 10× manjši količini morskega agarja za boljše strjevanje dodali bakteriološki agar, v tretjem tipu gojišča pa smo namesto bakteriološkega agarja dodali gelanski gumi). Po večkratnem precepljanju smo izolirali 24 čistih kultur. Vse izolate smo barvali po Gramu in ugotovili, da smo izolirali večinoma koke. Opisali smo tudi kolonije, ki so bile okrogle in raznoliko obarvane (rožnate, rumene, oranžne, bele in krem).

Iz čistih kultur in direktno iz sedimentnih vzorcev smo izolirali genomsko DNK, nato pa smo v verižni reakciji s polimerazo z začetnima oligonukleotidoma F338gc in 518R pomnožili dele genov za 16S rRNK. Pri pomnoževanju 16S rDNK iz izolatov smo pri različnih izolatih dobili pomnožke, dolge okrog 250 bp, vendar se je dolžina produktov nepričakovano razlikovala tudi do 23 %. Zato smo točno dolžino produktov PCR določili z bioanalizatorjem Agilent 2100 in ugotovili, da so pomnožki dolgi od 213 do 277 bp. Glede na dolžino pomnožka smo izolate razvrstili v štiri skupine, v skupino 5 pa smo uvrstili preostalih pet izolatov, ki jih nismo mogli uvrstiti v ostale 4 skupine. Pri izolatih iz skupine 4 smo opazili dva različno dolga pomnožka PCR.

Z analizo DGGE smo ugotovili, da so profili nekaterih izolatov enaki, predvidevali smo, da so si ti izolati tudi filogenetsko sorodni. Na gel smo nanesti tudi pomnoženo DNK iz sedimentnih vzorcev, kar nam je omogočilo vpogled v pestrost mikrobne združbe v sedimentu. Ugotovili smo, da smo z gojitvenim pristopom odkrili manj številčne predstavnike sedimentne združbe, saj se je le nekaj DGGE pasov iz čistih kultur ustavilo na istih mestih kot pomembnejši pasovi DGGE profila iz sedimentnih vzorcev.

Ker smo želeli ugotoviti, ali so si skupine, ki smo jih ustvarili samo glede na izbrane kriterije, tudi taksonomsko sorodne, smo poskusili pridobiti sekvence po enega izolata iz skupin 1, 2 in 3 ter vseh izolatov iz skupine 4 (imajo tudi enak DGGE profil) in 5. Zato smo celotno 16S rDNK teh izolatov pomnožili z začetnima oligonukleotidoma fD1 in 1392RU. Od 15 izbranih izolatov smo uspešno pridobili sekvence desetih izolatov. Sekvence smo preliminarно taksonomsko uvrstili z orodjem Classifier v bazi podatkov RDP II.9. Vsi izolati iz skupine 4 so se uvrstili v družino *Vibrionaceae*, trije so se uvrstili v rod *Vibrio*, trije v rod *Listonella*, najbližje pa jim je *Vibrio natriegens*. Sekvence preostalih štirih izolatov so bile dokaj slabe, zato natančnejša uvrstitev ni bila mogoča. Izolata I₃₂1-2 (skupina 1) in I₃₂2-9 (skupina 5) smo uvrstili v družino *Rhodobacteraceae*, izolata I₃₂1-12 in I₃₂2-5 iz skupine 3 pa smo uvrstili v debló *Firmicutes*.

7 VIRI

Akagawa-Matsushita M., Matsuo M., Koga Y., Yamasato K. 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 4: 621-627

Alič S., Kladnik D. 1999. Tržaški zaliv. V: Enciklopedija Slovenije. 13. zvezek. Javornik M. (ed.) Ljubljana, Založba Mladinska Knjiga: 381-382

Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59, 1: 143-169

Bio-Rad. 2007. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Hercules, Bio-Rad Laboratories, ZDA
<http://www.bio-rad.com> (november 2007): 3str.

Braker G., Ayala del Rio H.L., Devol A.H., Fesefeldt A., Tiedje J.M. 2001. Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in Pacific northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology, 67, 4: 1893-1901

Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. 2005. Taxonomic outline of the archaea and bacteria. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 2, part A. Garrity G.M. (ed.). Berlin, Springer: 207-220

Burnett W.C., Aggarwal P.K., Bokuniewicz H., Cable J.E., Charette M.A., Kontar E., Krupa S., Kulkarni K.M., Loveless A., Moore W.S., Oberdorfer J.A., Oliveira J., Ozyurt N., Povinec P., Privitera A.M.G., Rajar R., Ramessur R.T., Scholten J., Stieglitz T., Taniguchi M., Turner J.V. 2006. Quantifying submarine groundwater discharge in the coastal zone via multiple methods. Science of the Total Environment, 367, 2: 498-543

Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D.M., Garrity G.M., Tiedje J.M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research, 33, Spec. Iss. D294-D296

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

EBI - European Bioinformatics Institute. 2007 EMBL nucleotide sequence database. Cambridge, European Bioinformatics Institute. (junij 2007)
<http://www.ebi.ac.uk/embl/> (julij 2007): 2 str.

Faganeli J., Ogrinc N., Walter L.M., Žumer J. 2005. Geochemical characterization of submarine spring of Izola (Gulf of Trieste, N Adriatic Sea). Materials and Geoenvironment, 52,1: 35-39

Farmer J.J., Janda J.M. 2005. Order XI. Vibrionales. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 2, part B. Garrity G.M. (ed.). Berlin, Springer: 491-556

Ferris M.J., Muyzer G., Ward D.M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Applied and Environmental Microbiology, 62, 2: 340-346

Fish S.A., Shepherd T.J., McGenity T.J., Grant W.D. 2002. Recovery of 16S ribosomal RNA gene fragments from ancient halite. *Nature*, 417: 432-436

Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T. 2005. Order III. Rhodobacterales *ord. nov.* V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 2, part C. Garrity G.M. (ed.). Berlin, Springer: 161-230

Geets J., Borremans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., van der Lelie D., Vanbroekhoven K. 2006. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 194-205

Handelsman J. 2004. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 4: 669-685

Herndl G.J., Peduzzi P., Fanuko N. 1989. Benthic community metabolism and microbial dynamics in Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series*, 53: 169-178

Hines M.E., Faganeli J., Planinc R. 1997. Sedimentary anaerobic microbial biogeochemistry in the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: Influences of bottom water oxygen depletion. *Biogeochemistry*, 39: 65-86

Janssen P.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M., Sait M. 2002. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5: 2391-2396

Johannes R.E. 1980. The ecological significance of the submarine discharge of groundwater. *Marine Ecology*, 3: 365-373

Kaeberlein T., Lewis K., Epstein S.S. 2002. Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in stimulated natural environment. *Science*, 296: 1127-1129

Keller M., Zengler K. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 2: 141-150

Klemenčič N. 2006. Fenotipska in genotipska opredelitev bakterijskih izolatov iz morskih in sladkovodnih sedimentov. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 80 str.

Köpke B., Wilms R., Engelen B., Cypionka H., Sass H. 2005. Microbial diversity in coastal subsurface sediments: a cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 7819-7830

Kumar S., Tamura K., Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 2: 150-163

Lee O.O., Tsoi M.M.Y., Li X., Wong P.K., Qian P.Y. 2007. *Thalassococcus halodurans* gen. nov., sp nov., a novel halotolerant member of the *Roseobacter* clade isolated from the marine sponge *Halichondria panicea* at Friday Harbor, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 8: 1919-1924

Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R. 1998. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 7: 2691-2696

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. New Jersey, Pearson Education, Inc.: 1019 str.

Miller D.N., Bryant J.E., Madsen E.L., Ghiorse W.C. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 11: 4715-4724

Moore W.S. 1999. The subterranean estuary: a reaction zone of ground water and sea water. *Marine Chemistry*, 65: 111-125

Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700

NCBI - National Center for Biotechnology Information . 1993. BLAST. Bethesda, National Center for Biotechnology Information -NCBI (junij 2007)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (julij 2007): 4 str.

Nealson K.H. 1997. Sediment bacteria: Who's there, what are they doing, and what's new? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 25: 403-434

Nübel U., Engelen B., Felske A., Snaird J., Weishuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178, 19: 5636-5643

Ogrinc N., Faganeli J., Pezdic J. 2003. Determination of organic carbon remineralization in near-shore marine sediments (Gulf of Trieste, Northern Adriatic) using stable carbon isotopes. *Organic Geochemistry*, 34: 681-692

Oremland R.S., Capone D.G., Stolz J.F., Fuhrman J. 2005. Whither or wither geomicrobiology in the era of 'community metagenomics'. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 572-578

Orožen Adamič M. 2002. Geomorfološke značilnosti Tržaškega zaliva in obrobja. V: Dela - Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo: 143-155

Podar M., Abulencia C.B., Walcher M., Hutchison D., Zengler K., Garcia J.A., Holland T., Cotton D., Hauser L., Keller M. 2007. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 10: 3205-3214

Rappé M.S., Giovannoni S.J. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57: 369-394

Russo A., Artegiani A. 1996. Adriatic Sea hydrography. *Scientia Marina*, 60, Suppl. 2: 33-43

Santoro A.E., Boehm A.B., Francis C.A. 2006. Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3: 2102-2109

Simmons G.M. Jr. 1992. Importance of submarine groundwater discharge (SGWD) and seawater cycling to material flux across sediment/water interfaces in marine environments. *Marine Ecology Progress Series*, 84: 173-184

Surajit Das, Lyla P.S., Ajmal Khan S. 2006. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science*, 90, 10: 1325-1335

Suzuki M, Rappé S.M., Giovannoni S.J. 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 11: 4522-4529

Taniguchi M., Burnett W.C., Cable J.E. 2002. Investigation of submarine groundwater discharge. *Hydrological Processes*, 16, 11: 2115-2129

Thompson F.L., Iida T., Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 3: 403-431

Tong Z., Bischoff M., Nies L., Applegate B., Turco R.F. 2007. Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environmental Science & Technology*, 41: 2985-2991

UNESCO. 2004. Submarine groundwater discharge: Management implications, measurements and effects. Pariz, United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization - UNESCO
<http://unesdoc.unesco.org/images/0013/001344/134436e.pdf> (oktober 2007): 35 str

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173, 2: 697-703

Wilms R., Sass H., Köpke B., Köster J., Cypionka H., Engelen B. 2006. Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4: 1756-1764

Zengler K., Toledo G., Rappé M., Elkins J., Mathur E.J., Short J.M., Keller M. 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 24: 15681-15686

Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2: 316-322

Žumer J. 2004. Odkritje podmorskih termalnih izvirov pred Izolo. *Geografski obzornik*, 51, 2: 11-17

ZAHVALE

Iskrena hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A: Sekvence izolatov iz sedimentov podvodnega izvira Izola 32 v Fasta formatu v surovi in popravljeni obliki. Sekvencam sledijo rezultati iskanja najbolj podobnih sekvenc v bazah podatkov NCBI in EBI z dne 5. 7. 2007. Pri sekvencah I₃₂1-6, I₃₂1-7, I₃₂1-8, I₃₂1-9, I₃₂3-2 in I₃₂3-3 so označena tudi mesta naleganja začetnih oligonukleotidov F338gc in 518R.

F338 5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG - 3'

518R 5' - GTATTACCGCGGCTGCTGG - 3'

518R kompl. 5' – CCAGCAGCCGCGGTAATAC – 3'

Priloga A1: Sekvenca izolata I₃₂1-6 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂1-6

```
GGGTCGGNCGNNTTGACGTGGCTAGTCAACGGNAATNNNTNATNTGANCCTGNCNNAANACACCNCCTGAGAGNNTCGNTNCGGTGAGT
AATGCCCAGGANATTGNNNTTGTATGTNGGNGNATAACCAANTTGNNAANGGATGGCATANTACCTGCNTGATGCCTACGGNCCAAAGAGGG
GGACCTTCGNNCCTCTCGCGNANGATATGCCTAGGTNGGATTAGCTANTTTGGTGAGGGAAGGNTCACCAGGCAACGATCCCTAGCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGNAACTGANACACGGNCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
NCTTTATGACGCCATGCCCGCTTGTATAAANAAGTCCTTTGCGGNTTTGAAAAAGTNNCTNNTCAGTCGGTGAAGGNAAGNGCGGNTTTC
GATTATATGAGCCGGCTGTTGTTTTGAACGTTAGCGACAAGAAAGAACGCCGNTCTAANNCTCTNTGCCAAGCAGCCCGGTATAATAC
GGAGGGGTGCGAGCNTTANTCGGAAATTACTGGGGCGTAAAGCNTATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCANATGNGAAANNCCCCGGGGCTCNAAC
CTCGGAATANNATTTNAACTGGCAGACTAGACTAGTGTAGAGGGGGGNAANAATTTNCAGGTGTAGCGGTNAANTGCGTANAANNCTCTGA
AGAAAATACCGGNGGGGNAAGGGCCNNCCCCCTGGAACAANATACCTGAACACTTCAGAATGCCNAAAAGGGGNGGGGGGANGCAAAACC
GGGGATTAAGNATCCCCCTGGGTNACNNCCC
```

> I₃₂1-6 popravlj.

```
GGGTCGGCCGGGTTGACGTGGCTAGTCAACGGGAATGTGTATTGTAACCTGNCNCGAAACACACCGCCGTGAGAGGTCGGTTCGGGTGAGT
AATGCCCAGGAATTGTNNNTTGTATGTGGGNGNATAACCAAGTTGGAACGGATGGCATANTACCTGCNTGATGCCTACGGGCCAAAGAGGG
GGACCTTCGNGCCTCTCGCGTCAGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGGAAGGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGANACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTTTATGACGCCATGCCCGCTTGTATAAANAAGTCCTTTGCGGTTTGAAGAAAGTTACTTTTCAGTCGGTGAAGGAAAGGCGGTTTTC
GATTATATGAGCCGGCTGTTGTTTTGAACGTTAGCGACAAGAAAGAACGCCGNTCTAANTCTCTGTGCCAGCAGCCGGGTAATACGGA
GGGGTGGCAGCCTTAATCGGAAATTACTGGGGCGTAAAGCGTATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAATGTGAAACCCCGGGGCTCCACCTC
GGAATACCATTTGAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGAAAGAAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATTCGCTAAAGATCTGAAGA
AAATACCGGTGGGCGAAAGGCCGGCCCCCTGGAACAAGATACCTGAACACTTCAGAATGCCGAAAAGGGGTGGGGGGAGGCAAAACCGGG
GATTAAGATCCCCCTGGGTACGTCCC
```

NCBI – BLAST (I₃₂1-6)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
DQ530293.1	Vibrio sp. LAR5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
DQ530291.1	Vibrio sp. LAR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
AY332398.1	Vibrio sp. LAR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	85%	0.0	87%
DQ513193.1	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
DQ647618.1	Vibrio sp. 99WF10-27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
DQ985832.1	Bacterium WP2ISO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
AF410778.1	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
AF064637.1	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
AY580869.1	Uncultured gamma proteobacterium clone PI_4s10h 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
DQ647617.1	Vibrio sp. 99WF10-51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%
DQ985815.1	Bacterium WP1ISO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	84%	0.0	88%
DQ664544.1	Vibrio alginolyticus strain RH2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0.0	86%
DQ497398.1	Vibrio parahaemolyticus strain 93A-5807 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	90%	0.0	86%
EF187008.1	Vibrio sp. gt2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	84%	0.0	88%
DQ985826.1	Bacterium WP1ISO16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	85%	0.0	87%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂1-6)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM_PRO:DQ091240	Pseudomonas sp. FL13-4-2 16S	74.538	74.538	703
EM_PRO:BA000031	Vibrio parahaemolyticus RIMD	86.747	86.747	415
EM_PRO:BA000031	Vibrio parahaemolyticus RIMD	86.747	86.747	415
EM_PRO:BA000032	Vibrio parahaemolyticus RIMD	86.747	86.747	415
EM_PRO:BA000031	Vibrio parahaemolyticus RIMD	86.747	86.747	415
EM_PRO:AY910946	Marine sediment bacterium IS	86.747	86.747	415
EM_PRO:AJ508771	Vibrio sp. TR1 partial 16S r	83.850	83.850	452
EM_PRO:BA000031	Vibrio parahaemolyticus RIMD	86.506	86.506	415
EM_PRO:EF199930	Bacterium X11 16S ribosomal	84.479	84.479	451
EM_PRO:EF219054	Vibrio alginolyticus strain	86.385	86.385	426
EM_PRO:DQ497398	Vibrio parahaemolyticus stra	86.333	86.333	439
EM_PRO:EF187016	Vibrio sp. BA2 16S ribosomal	85.057	85.057	435
EM_PRO:DQ146987	Vibrio sp. V615 16S ribosoma	86.047	86.047	430
EM_PRO:AY332398	Vibrio sp. LAR1 16S ribosoma	86.279	86.279	430
EM_PRO:AY911391	Vibrio parahaemolyticus stra	87.229	87.229	415

Priloga A2: Sekvenca izolata I₃₂1-7 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂1-7

TNNNNNGNTCGCNGNGGNTNNNCATNTGCTAGTGAGCGGAACGNTTATCTGANCCCTTCGGGNAACGATAACGGCGTCGAGCGNCGNACGG
GTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTTGATGTGGGGNATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCCTACGGGCCAAAGAGGG
GGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGNGAGGTAAGGNTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGNAATATTGCACAATGGGCGCAAG
CCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGNACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCTTAATAGCGGCGT
TGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCNTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTAAAGCCCGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAACTGGCAGACTAGAGT
ACTGTAGAGGGGGNAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGNCCCCNTGNACAGAT
NCTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCNTGGTAGTCCACNCCGTAACNATNTCTACTTGGAGGNNGT
GNCTTTGAGCNGTGNNTTTCGGAGCTANCGC

> I₃₂1-7 popravljen.

TCGCGGGGGTTAACATTTGCTAGTGAGCGGAACGTGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
TGCCCTAGGAAATTGCCCTTGATGTGGGGGATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTC
GGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAAGGTAAGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
AGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCTTAATAGCGGCGTGTGTTGAC
GTTAGCGACAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAA
GCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGA
GGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGCCCCCTGGACAGATACTGACACT
CAGATGCGAAAGCGTGGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGCTTTGAG
CTGTGTTTTTCGGAGCTACCGC

NCBI – BLAST (I₃₂1-7)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
DQ530291.1	Vibrio sp. LAR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	98%
AY332398.1	Vibrio sp. LAR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	98%	0.0	98%
DQ513193.1	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	98%
DQ985832.1	Bacterium WP2ISO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	98%
AF064637.1	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	98%
AY580864.1	Uncultured gamma proteobacterium clone PI_4a6e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	98%
DQ530293.1	Vibrio sp. LAR5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	97%
DQ530288.1	Vibrio sp. EHP5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	97%
DQ642827.1	Vibrio sp. 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	97%
AF410779.1	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	97%
DQ146987.1	Vibrio sp. V615 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	97%
EF187008.1	Vibrio sp. gt2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	98%
AF410778.1	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	98%
DQ985874.1	Bacterium WP3ISO13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	97%
DQ664544.1	Vibrio alginolyticus strain RH2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	96%	0.0	98%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂1-7)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM PRO:AY332398	Vibrio sp. LAR1 16S ribosoma	97.969	97.969	837
EM PRO:AF064637	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosom	97.969	97.969	837
EM PRO:DQ513193	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal	97.969	97.969	837
EM PRO:DQ985832	Bacterium WP2ISO5 16S riboso	97.969	97.969	837
EM PRO:DQ146987	Vibrio sp. V615 16S ribosoma	97.730	97.730	837
EM PRO:AF410779	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S r	97.611	97.730	837
EM PRO:DQ985874	Bacterium WP3ISO13 16S ribos	97.611	97.611	837
EM PRO:DQ642827	Vibrio sp. 21 16S ribosomal	97.590	98.193	830
EM PRO:DQ664544	Vibrio alginolyticus strain	98.407	98.407	816
EM PRO:AF410778	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S r	98.411	98.411	818
EM PRO:DQ767690	Vibrio sp. SS 16S ribosomal	96.801	96.801	844
EM PRO:AF513447	Vibrio alginolyticus 16S rib	97.714	97.714	831
EM PRO:EF187008	Vibrio sp. gt2 16S ribosomal	98.409	98.409	817
EM PRO:EF100859	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribo	98.044	98.411	818
EM PRO:DQ497398	Vibrio parahaemolyticus stra	98.164	98.164	817

Priloga A3: Sekvenca izolata I₃₂1-8 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂1-8

CGNNGNNGGTNTACTNTGCNAGTNGAGCGGAAACGNGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
TGCCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGNATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCG
GGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGACGAGTGGGNAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGNACTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACG
TTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGNAATTACTGGGCGTAAAG
CGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAG
GGGGGTAGAAATTTAGGTGTAGCGGTNAAATGCCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTTGACAGATACTGACAC
TCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGNATTAGATACCTGGTAGTCCACNCCGTAACGATNTCTACTTGGNGGTTGTGGCTTTGAGC
NGTGTTTTTCCGANCTANCGNTTAANTAAAC

> I₃₂1-8 popravljen.

GAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCCTAGGAAATTGCCCTGATGTG
GGGGAATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCT
AGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAG
ACACGGTCCAGACTCTCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGG
CCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCAGGCT
AACTCCGTGCGCAGCAGCGCGGTAATACGGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTC
AGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGTGAATTTACGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCA
AACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCTTTGAGCCTGTGTTTCCGGAACCTAACCTTA
AGTAAAC

NCBI – BLAST (I₃₂1-8)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
DQ530291.1	Vibrio sp. LAR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
AY332398.1	Vibrio sp. LAR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0.0	99%
DQ513193.1	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
DQ985832.1	Bacterium WP2ISO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
AF064637.1	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
AY580864.1	Uncultured gamma proteobacterium clone PI_4a6e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
DQ530293.1	Vibrio sp. LAR5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
DQ642827.1	Vibrio sp. 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
AF410779.1	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
AF410778.1	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
DQ146987.1	Vibrio sp. V615 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
DQ530288.1	Vibrio sp. EHP5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	99%
EF100859.1	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
DQ985874.1	Bacterium WP3ISO13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
DQ642824.1	Vibrio sp. 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂1-8)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM PRO:AY332398	Vibrio sp. LAR1 16S ribosoma	99.154	99.154	827
EM PRO:AF064637	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosom	99.154	99.154	827
EM PRO:DQ513193	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal	99.154	99.154	827
EM PRO:DQ985832	Bacterium WP2ISO5 16S riboso	99.154	99.154	827
EM PRO:DQ642827	Vibrio sp. 21 16S ribosomal	98.549	99.154	827
EM PRO:DQ146987	Vibrio sp. V615 16S ribosoma	98.912	98.912	827
EM PRO:AF410779	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S r	98.791	98.912	827
EM PRO:AF410778	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S r	98.912	98.912	827
EM PRO:EF100859	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribo	98.549	98.912	827
EM PRO:DQ985874	Bacterium WP3ISO13 16S ribos	98.791	98.791	827
EM PRO:AF513447	Vibrio alginolyticus 16S rib	98.670	98.670	827
EM PRO:DQ642824	Vibrio sp. 18 16S ribosomal	98.428	99.033	827
EM PRO:DQ767690	Vibrio sp. SS 16S ribosomal	98.428	98.428	827
EM PRO:DQ159098	Bacterium PAH-A6 16S ribosom	98.549	98.549	827
EM PRO:EF203212	Vibrio parahaemolyticus stra	98.428	98.428	827

Priloga A4: Sekvenca izolata I₃₂1-9 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂1-9

TNNNNNTNGNTCGCNGGGGGTNTTCNTTGCTAGTGAGCGGAAACGNGTTATCTGANCCCTTCGGNNAACGATAACGNCGTCGAGCGNCGGAC
GGGTGAGTAATGCCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGNATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCACGGGCCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGNAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGNACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCG
TTGTTTACGTTAGCGACAGAGAAGACACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCNTTTGAAACTGGCAGACTAGAG
TACTGTAGAGGGGGGTAGAAATTTACAGGTGTAGCGGTAAAATGCGTAGAGATCTGAAGAAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCNTGGACAGA
TACTGACACTCAGATGCGAANGCGGGGGAGCAACAGNATNANATACCNTGGTAGTCCNCGCCGNAAANCATGTCTACTTGGAGGTTGT
GCCCTNGAGCNGTGGNTTTCGGANCTANCNC

> I₃₂1-9 popravlj.

TNNNNNTNGNTCGCNGGGGGTNTTCNTTGCTAGTGAGCGGAAACGNGTTATCTGANCCCTTCGGGAACGATAACGNCGTCGAGCGCGGAC
GGGTGAGTAATGCCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGNATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCACGGGCCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAA
GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGNACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCG
TTGTTTACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAG
TACTGTAGAGGGGGGTAGAAATTTACAGGTGTAGCGGTAAAATGCGTAGAGATCTGAAGAAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCNTGGACAGA
TACTGACACTCAGATGCGAANGCGGGGGAGCAACAGGATAGATACCCTGGTAGTCCNCGCCGNAAANCATGTCTACTTGGAGGTTGT
GCCCTNGAGCNGTGGNTTTCGGANCTACGCG

NCBI – BLAST (I₃₂1-9)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
DQ530291.1	Vibrio sp. LAR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
AY332398.1	Vibrio sp. LAR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	99%	0.0	98%
DQ513193.1	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
DQ985832.1	Bacterium WP2ISO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
AF064637.1	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
AY580864.1	Uncultured gamma proteobacterium clone PI_4a6e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
DQ146987.1	Vibrio sp. V615 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
DQ642827.1	Vibrio sp. 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	97%
DQ530293.1	Vibrio sp. LAR5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	97%
DQ985874.1	Bacterium WP3ISO13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	97%
DQ642824.1	Vibrio sp. 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	97%
AF410779.1	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	97%
DQ530288.1	Vibrio sp. EHP5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	97%
AF410778.1	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	98%
EF100859.1	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99%	0.0	97%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂1-9)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM PRO:AY332398	Vibrio sp. LAR1 16S ribosoma	98.180	98.180	824
EM PRO:AF064637	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosom	98.180	98.180	824
EM PRO:DQ513193	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal	98.180	98.180	824
EM PRO:DQ985832	Bacterium WP2ISO5 16S riboso	98.180	98.180	824
EM PRO:DQ146987	Vibrio sp. V615 16S ribosoma	98.058	98.058	824
EM PRO:DQ642827	Vibrio sp. 21 16S ribosomal	97.694	98.180	824
EM PRO:AF410779	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S r	97.816	97.937	824
EM PRO:DQ985874	Bacterium WP3ISO13 16S ribos	97.937	97.937	824
EM PRO:AF410778	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S r	98.162	98.162	816
EM PRO:EF100859	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribo	97.917	98.162	816
EM PRO:AF513447	Vibrio alginolyticus 16S rib	97.694	97.694	824
EM PRO:DQ642824	Vibrio sp. 18 16S ribosomal	97.917	98.407	816
EM PRO:DQ767690	Vibrio sp. SS 16S ribosomal	97.573	97.451	824
EM PRO:DQ159098	Bacterium PAH-A6 16S ribosom	97.794	97.794	816
EM PRO:EF542798	Vibrio alginolyticus strain	97.451	97.451	824

Priloga A5: Sekvenca izolata I₃₂3-2 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂3-2

GNTCGCGGGGTTNCTGTCTNAGTGAGCGGAAACGNGTTATCTGANCTTCGGGNAACGATANCNCGTCGAGNGTCGNACGGGTGAGTAAT
GCCTAGGAAATTGCCCTTGATGTGGGGNATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCG
GGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGNTTGTAAAGNACTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACG
TTAGCGACANAAGAAGCACCGGNTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAAATACGGAGGGTGCGAGCNTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCATGCAGGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTNAANCCCCGGGCTCANCTCGAAATAGCNTTTNAAACTGGCAGACTAGAGTANTGTAAAG
AGGGGGANAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTNAATGCGTAGAGATCTGAAGAAATACCGGTGGCGAAGGCGNCCCCCTGGACAGATACTGACA
NTCAGATGCAAAAAGCGNNGGGGANCAACAGGATTNAGATNCCNTGGNTAGTCCNCCNNAACGATGTCTACTTNGGAGGTTTGTGGC
CTTTGGACCNGNNTTTTCGNANCTAACGCN

> I₃₂3-2 popravlj.

TCGCGGGGGTTACTGTCAGTGAGCGGAAACGTTTATCTGATCCTTCGGGGAACGATANCNCGTCGAGCGTCGACGGGTGAGTAATGC
CTAGGAAATTGCCCTTGATGTGGGGNATAACCATTTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGG
CCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGAT
GATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCGACGATGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGC
CATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCGTTAATAGCGGCGTTGTTTGACGTT
AGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
CATGCGAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTAAAGCCCCGGGGCTCACCTCGAAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAAAGAG
GGGGAAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTAAATGCGTAGAGATCTGAAGAAATACCGGTGGCGAAGGCGCCCCCTGGACAGATACTGACACT
CAGATGCAAAAAGCGTGGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGGTAGTCCACACCGAAGGATGTCTACTTGGAGGTTTGTGGCCCT
TTGGACCCGTGTTTTCGGAACCTAACGC

NCBI – BLAST (I₃₂3-2)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
DQ530291.1	Vibrio sp. LAR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
AY332398.1	Vibrio sp. LAR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	97%	0.0	96%
DQ513193.1	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
DQ985832.1	Bacterium WP2ISO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
AF064637.1	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
AY580864.1	Uncultured gamma proteobacterium clone PI_4a6e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
DQ530293.1	Vibrio sp. LAR5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
DQ642827.1	Vibrio sp. 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
DQ642824.1	Vibrio sp. 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
AF410779.1	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
AF410778.1	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
DQ146987.1	Vibrio sp. V615 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
DQ530288.1	Vibrio sp. EHP5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
DQ985874.1	Bacterium WP3ISO13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%
EF100859.1	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	0.0	96%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂3-2)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM PRO:AY332398	Vibrio sp. LAR1 16S ribosoma	96.731	96.731	826
EM PRO:AF064637	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosom	96.731	96.731	826
EM PRO:DQ513193	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal	96.731	96.731	826
EM PRO:DQ985832	Bacterium WP2ISO5 16S riboso	96.731	96.731	826
EM PRO:DQ642827	Vibrio sp. 21 16S ribosomal	96.126	96.731	826
EM PRO:DQ146987	Vibrio sp. V615 16S ribosoma	96.489	96.489	826
EM PRO:AF410779	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S r	96.368	96.489	826
EM PRO:AF410778	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S r	96.489	96.489	826
EM PRO:DQ642824	Vibrio sp. 18 16S ribosomal	95.368	95.962	842
EM PRO:EF100859	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribo	96.126	96.489	826
EM PRO:DQ985874	Bacterium WP3ISO13 16S ribos	96.368	96.368	826
EM PRO:AF513447	Vibrio alginolyticus 16S rib	96.247	96.247	826
EM PRO:EF199920	Vibrio sp. DH95 16S ribosoma	95.620	95.620	822
EM PRO:DQ767690	Vibrio sp. SS 16S ribosomal	96.005	96.005	826
EM PRO:DQ985820	Bacterium WP1ISO10 16S ribos	96.871	96.871	799

Priloga A6: Sekvenca izolata I₃₂3-3 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂3-3

TANNNNNNGNNNCNANGGNGNTTACNATGCGNAGTCGAGCGGAAACGNGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGNCGTGAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAATGCCTAGNAAATTGCCCTGATGTGGGGNATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGA
GGGGGACCTTCGNCCTCTCGCTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGNCCTACCAAGGCGACGATCCCTAGC
TGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAANGCCTTCGGTTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCTTAATAGCGG
CNTTGTGTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGNTAANTCCGTGCCAGCAGCGCGATAATACGGAGGGNCGCAGCGTTAATCGNAATTA
CTGGGCGTAAAGCGCATGCGGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTNAANCCCCGGGNCCTCAACNTCGNAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAG
AGTANTGTAGAGGGGGGAGAAATTTTCAGGTGTAGCGGNAAAAATGCGTAGAGATCTGAAGAAAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCNNTG
AACAGATACTGNACACTCAGATGCAAAAAGNGGGGGGGNANCAAAACAGGATTAAGAATCNCCTTGGANACCCNCNCCGNNAAAACGAT
TNTTCTTACTTTGGGGAGGTTTGTNGNCCT

> I₃₂3-3 popravljen.

ATGCGAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGCGGTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGC
CCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAACGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTCGCTCAG
GATATGCCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAT
GGAACGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
TGAAGAAAGCCTTCGGTTTGTAAAGTACTTTTCAGTCGTGAGGAAGGCGGCGTCTTAATAGCGGCTTTGTTGACGTTAGCGACAGAAGAA
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGAAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCGGGTGGTT
TGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCTCGAAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAAATTTCA
GGTGTAGCGGAAAAATGCGTAGAGATCTGAAGAAAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTTGAACAGATACTGAACACTCAGATGCAAA
AAGCGGGGGGGGAGCAAAACAGGATTAAGAATCCCCCTGGATACCCACCGCGAAGAAACGATTGTTCTTACTTTGGGGAGGTTTGTGG

NCBI – BLAST (I₃₂3-3)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
DQ530293.1	Vibrio sp. LAR5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98%	0.0	95%
DQ530291.1	Vibrio sp. LAR2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
AY332398.1	Vibrio sp. LAR1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	95%	0.0	95%
DQ513193.1	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
DQ985832.1	Bacterium WP2ISO5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
AF064637.1	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
AY580869.1	Uncultured gamma proteobacterium clone PI_4s10h 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	92%	0.0	96%
DQ146987.1	Vibrio sp. V615 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
DQ530288.1	Vibrio sp. EHP5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
AY580864.1	Uncultured gamma proteobacterium clone PI_4a6e 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
DQ642827.1	Vibrio sp. 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
AF410779.1	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
DQ985874.1	Bacterium WP3ISO13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
DQ985820.1	Bacterium WP1ISO10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%
AF513447.1	Vibrio alginolyticus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	95%	0.0	95%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂3-3)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM PRO:AY332398	Vibrio sp. LAR1 16S ribosoma	95.547	95.547	786
EM PRO:AF064637	Vibrio sp. NAP-4 16S ribosom	95.547	95.547	786
EM PRO:DQ513193	Vibrio sp. SI9 16S ribosomal	95.547	95.547	786
EM PRO:DQ985832	Bacterium WP2ISO5 16S riboso	95.547	95.547	786
EM PRO:DQ146987	Vibrio sp. V615 16S ribosoma	95.420	95.420	786
EM PRO:AF410779	Vibrio sp. NLEP97-1599 16S r	95.293	95.293	786
EM PRO:DQ642827	Vibrio sp. 21 16S ribosomal	94.911	95.547	786
EM PRO:AF513447	Vibrio alginolyticus 16S rib	95.293	95.293	786
EM PRO:DQ985874	Bacterium WP3ISO13 16S ribos	95.293	95.293	786
EM PRO:DQ985820	Bacterium WP1ISO10 16S ribos	95.293	95.293	786
EM PRO:DQ985826	Bacterium WP1ISO16 16S ribos	96.649	96.649	746
EM PRO:AF410778	Vibrio sp. NLEP97-1598 16S r	95.391	95.391	781
EM PRO:DQ767690	Vibrio sp. SS 16S ribosomal	94.784	94.784	786
EM PRO:EF203212	Vibrio parahaemolyticus stra	94.911	94.911	786
EM PRO:EF100859	Vibrio sp. CON-A4-1 16S ribo	95.000	95.385	780

Priloga A7: Sekvenca izolata I₃₂1-2 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂1-2

GNNNNNGN TCGANNNGGTTTACCTGGCNCGCCANCCGCNCTTAGNATTGNNCCTGGACTCAGTAACCTCNCGCGGGGGAACNTACCNCG
ATCTAANGAANNCCNCCTGGNANCGGTNAGTACTACCTTANACNCCCTTCGGGGGAAANTATTTATCTTTNTTTGGATCGGCCCGCGTTA
GATTAGATAGTTGGTGGGTNAATGGCCTACCAAGTCTACGATCTATAGCTGNTTANAGAGGATGATCANCAACACNNGGACTGAGACACCC
CCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATCTTGNAACATGGGCACNAGTNTGNTCCAGCNATGCNCGCTGTTTNCATAAANGCCTTA
GGGNCTAAANGCTCTNCCGCCTGTGATGANAANGACTTTNGCAGTNAAGAAACNCTNTGATAACTCNNTNNCATCNGCTGGAGTTAAATA
CGGAGGGGNTTTTNGCGTTNTTGGGAAATNACNNNCCNTAAANNNTTNCGTTTCGCGGACTTTTAAATNAGGGGNANAAANNCGCGGNT
NTCACACCAANGGAANNCTNCCCTCAAATACTGGTAGCTCGNAAATTTTANAGANAGGGGGANTTGAAACNNCCNNGTGTATANA
NNNNNGAANNCCNGNAAGNAAATNTGGGNGAAACNCCNNTGNNNGGNAANNAGGGGNNNTCNTTNTNNTCNAATNTTTGNACCT
TAAAGGNANCAAAAAGTTNTGGGGGNNNAACNCCNGGTTTAAANANNCCTTTGGTTTATTNCCCCNCCNNTTGAAAAACAAAN
AAAAATTNCCNNANTTNGCCGGGGGNGGCGN

> I₃₂1-2 popravlj.

GGGTTTACCTGGCTGCCAGCCGCNCTTAGNATTGANCCTGGACTCAGTAACCTCGCGGGGGAACGTACCNCGATCTAAGGAATNCCC
NCCTGGNANCGGTGAGTACTACCTTANACNCCCTTCGGGGGAAAGTATTTATCTTTATTTGGATCGGCCCGGTTAGATTAGATAGTTGGT
GGGTNAATGGCCTACCAAGTCTACGATCTATAGCTGNTTANAGAGGATGATCANCAACACNNGGACTGAGACACCCCGGACTCCTACGG
GAGGACGAGCTGGGGAATCTTGNAACATGGGCACNAGTNTGNTCCAGCNATGCGCGGTGTTTGCATAAAGGCTTAGGGTCTAAAGCTCT
NCCGCCTGTGATGAAATGACTTTNGCAGTTAAAGAAACNCTNTGATAACTCNATNNCATCNGCTGGAGTTAAATACGGAGGGGNTTTTNG
CGTTCTCTGGAAATNACNGNCCNTAAANCTTTCGTTTCGCGGACTTTTAAATNAGGGGNAGAAANNCGCGGGATCTCACACCAANGGAA
NNCTGCCCCCTCAAATACTGGTAGCTCGGAAATTTNAGAGAGAGGGGGANTTGAAACNNCCNNGTGTATANANNNNGAANCNCG
NAAGNAAATNTGGGNGAAACNCCNNTGNNNGGNAANNAGGGGNCNNTCATTNTNNTCGTATTNTTGNACCTTTAAAGGNANCAAA
AAAGTTGTTGGGGGNNNAACNCCNGGTTTAAATANANNCCTTTGGTTTATTNCCCCCNCNNTTGAAAAACAAANAAAAATTGCCNNANT
TNGCCGGGGGNGGCGN

NCBI – BLAST (I₃₂1-2)

Accession	Description	Query covera ge	E value	Max ident
AY499417.1	Uncultured alpha proteobacterium clone RAI-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	2e-111	87%
AY580460.1	Uncultured alpha proteobacterium clone PI_RT169 16S ribosomal RNA gene gene, partial sequence	57%	2e-111	87%
AM501414.1	Ruegeria sp. Mbo12 partial 16s rRNA gene, strain Mbo12	57%	8e-111	86%
EF089467.1	Uncultured bacterium clone BB3S16S-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	3e-110	86%
DQ421494.1	Uncultured organism clone SIMO-4129 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	1e-108	86%
AY345413.1	Bacterium K2-53B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	1e-108	86%
EF491328.1	Uncultured alpha proteobacterium clone S2-06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54%	5e-108	87%
EF491274.1	Uncultured alpha proteobacterium clone S1-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54%	5e-108	87%
EF215736.1	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone GL2-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	54%	5e-108	87%
EF089482.1	Uncultured bacterium clone BB31NT16S-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	5e-108	86%
DQ881381.1	Uncultured Roseovarius sp. clone VT_077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	5e-108	86%
DQ881360.1	Uncultured Roseovarius sp. clone VT_055 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	5e-108	86%
DQ881350.1	Uncultured Roseovarius sp. clone VT_045 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	5e-108	86%
DQ881268.1	Uncultured Roseovarius sp. clone VB_044 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	5e-108	86%
DQ881120.1	Uncultured Roseovarius sp. clone DB_072 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	57%	5e-108	86%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂1-2)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM_PRO:AM501414	Ruegeria sp. Mbo12 partial 1	79.158	79.158	475
EM_PRO:AY345413	Bacterium K2-53B 16S ribosom	79.789	79.789	475
EM_PRO:AJ391182	marine alpha proteobacterium	79.158	79.158	475
EM_PRO:AY576710	Alpha proteobacterium 14III/	79.158	79.158	475
EM_PRO:AY536559	Roseobacter sp. TP9 16S ribo	79.158	79.158	475
EM_PRO:AF365990	Marine alpha proteobacterium	79.158	79.158	475
EM_PRO:AB180391	Rhodobacteraceae bacterium N	78.737	78.737	475
EM_PRO:AY369980	Roseobacter sp. J483 16S rib	78.947	78.947	475
EM_PRO:AJ784115	Rhodobacteraceae bacterium K	78.737	78.737	475
EM_PRO:AY136107	Roseobacter sp. MED61 16S ri	78.947	78.947	475
EM_PRO:AY368573	Roseobacter sp. J392 16S rib	79.399	79.399	466
EM_PRO:AJ810839	Rhodobacteraceae bacterium 2	78.737	78.737	475
EM_PRO:AJ810843	Rhodobacteraceae bacterium 1	78.737	78.737	475
EM_PRO:AF124521	Ruegeria atlantica 16S ribos	78.737	78.737	475
EM_PRO:DQ486500	Rhodobacteraceae bacterium D	78.737	78.737	475

Priloga A8: Sekvenca izolata I₃₂-9 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂-9

GGCATNNNNTTGATCANNNGGTGGTTTACAGNGGCANGGCGACCGCNCGCGTTTCGGGATTTAGCCCGCCACNAGATCACCTNACGCGTGGG
AACNTACCNGTAGCTAAGGAATACCCNCTGGNAANGGTNACTAATACCGTNATACNCCCTTCGGANNAAGATTTATCGTTTTTTGGATC
GNCCCGCGAGAGATTANATNGTTGGTGGGGTAANGCCCTACCAAGTCTACNATCTATAGCTGGTTTANAGAGGATGATCAGCNACACTGGGA
CTGAGACACNTCCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGTAAATCTTGGACANTGNCGCNAGNTTTATCNAGCTATGCCGNGTGAGTTAN
GGAANACCTTAGGNTNGTAAAGCTCTTTCGCTGGGANGATAAATAAACANNCCAGGAAAAATAAACNCCGGTTAANTCNGTGCCAGAC
AGCCGCGATNAATACGGGNGGNGNNTTANGCGTNTGTTGANAATTACTGGGNCGTAAANGNCAAACGTTGGCCGGTTNNTTNTTAAGTT
NNGGGGGTGAANATCCNCGGGGNNNTCNANCCCCNGAAAACNTCNTTTTAAAAAANTGGGTNGTCTTAAANTCCCNAAANAAGAGTTTTANG
NGAGAAATNTCCNAGAGTTTTANAGANTTAAANTTTNNNTAGGTTATTTTCGGAACAAAAACACCCAGTTGGNCAGNNNGCCCNNTTGNCT
TGGGCTTGGGAANTTTAAACCNTNAGGTNANAAAAAGNNGNGGGGGGCNAANCNGNNTTAGNNNNCCCCCTNGGNGNNNGNCCCC
CNCNCNNNAANNAATAAANCCCCCTN

> I₃₂-9 popravljen

GGCATNNNNTTGATCANNNGGTGGTTTACAGNGGCANGGCGACCGCNCGCGTTTCGGGATTTAGCCCGCCACNAGATCACCTNACGCGTGGG
AACNTACCNGTAGCTAAGGAATACCCNCTGGNAANGGTNACTAATACCGTNATACNCCCTTCGGANNAAGATTTATCGTTTTTTGGATC
GNCCCGCGAGAGATTANATNGTTGGTGGGGTAANGCCCTACCAAGTCTACNATCTATAGCTGGTTTANAGAGGATGATCAGCNACACTGGGA
CTGAGACACNTCCCANACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGTAAATCTTGGACANTGNCGCNAGNTTTATCNAGCTATGCCGNGTGAGTTAN
GGAANACCTTAGGNTNGTAAAGCTCTTTCGCTGGGANGATAAATAAACANNCCAGGAAAAATAAACNCCGGTTAANTCNGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGGGNGGNGNNTTATGCGTGTGTCGANAATTACTGGGCGGTAAANGGCAACGTTGGCCGGTTNNTTNTTAAGTTNN
GGGGGTGAANATCCNCGGGGTNCTCAACCCCGGAAACGTCNTTTTAAAAAANTGGGTNGTCTTAAANTCCCNAAAGAGTTTTANGTG
AGAAATNTCCCGAGTTTTAGAGANTTAAATTTAGNTAGGTTATTTTCGGAACAAAAACACCCAGTTGGNCAGAGAGCCCNNTTGACTTG
GGCCTTNGGATATTTTAAACCNTNGAGGTNACAAAAAGNNGTGGNGGGGGCNAACAGNGNTTAGNNNNCCCCCTNGGNGNNNGNCCCCA
CCCCCGGTAAANAGNAATAAANCCCCCTN

NCBI – BLAST (I₃₂-9)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
EF587965.1	Rhodobacteraceae bacterium UST061013-021 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	5e-109	81%
AY136107.1	Roseobacter sp. MED61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	5e-109	81%
AY435209.1	Uncultured Roseobacter sp. clone HPB-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	7e-108	81%
EF588002.1	Rhodobacteraceae bacterium UST061013-070 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	2e-107	81%
AY499417.1	Uncultured alpha proteobacterium clone RAI-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	2e-107	81%
AY580460.1	Uncultured alpha proteobacterium clone PI_RT169 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	2e-107	81%
EF587989.1	Rhodobacteraceae bacterium UST061013-053 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	3e-106	81%
EF582439.1	Uncultured bacterium clone Sm3-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	59%	3e-106	79%
DQ486500.1	Rhodobacteraceae bacterium DG1287 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	1e-105	81%
DQ446156.2	Uncultured alpha proteobacterium clone BBD_217_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	1e-105	81%
DQ446154.2	Uncultured alpha proteobacterium clone BBD_217_09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	1e-105	81%
EF491328.1	Uncultured alpha proteobacterium clone S2-06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	1e-105	81%
EF491274.1	Uncultured alpha proteobacterium clone S1-13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	1e-105	81%
EF215736.1	Uncultured Rhodobacteraceae bacterium clone GL2-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	1e-105	81%
EF089467.1	Uncultured bacterium clone BB3S16S-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	50%	1e-105	81%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂-9)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM PRO:AY033321	Alpha proteobacterium R2A57	75.717	75.717	523
EM PRO:AY369980	Roseobacter sp. J483 16S rib	76.731	76.731	520
EM PRO:AY136107	Roseobacter sp. MED61 16S ri	79.095	79.095	464
EM PRO:AY005463	Ruegeria sp. MB2 16S ribosom	76.134	76.134	507
EM PRO:AY772092	Marinosulfonomonas methylotr	75.577	75.577	520
EM PRO:AJ391182	marine alpha proteobacterium	76.154	76.154	520
EM PRO:AY576710	Alpha proteobacterium 14III/	76.154	76.154	520
EM PRO:AY962292	Rhodobacteraceae bacterium C	76.154	76.154	520
EM PRO:DQ334348	Bacterium CWISO10 16S riboso	76.562	76.562	512
EM PRO:AF365990	Marine alpha proteobacterium	76.154	76.154	520
EM PRO:DQ397336	Thalassococcus halodurans st	76.413	76.413	513
EM PRO:AY536559	Roseobacter sp. TP9 16S ribo	75.977	75.977	512
EM PRO:DQ486500	Rhodobacteraceae bacterium D	76.031	76.031	509
EM PRO:AY745857	Roseobacter sp. JL-135 16S r	76.667	76.667	510
EM PRO:AY745856	Roseobacter sp. JL-132 16S r	76.667	76.667	510

Priloga A9: Sekvenca izolata I₃₂1-12 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂1-12

CGNNGGTTGATCTGGCTANTCACACCGGNCGTNNNTTTTCTCNGNNANACCCACCGCNGGNGNTNTTTATCCTGGNNAACNACCCCGNN
GGNNTTTTNTTTTCTTCNGNAANANNCCNCNCGGGGATANTTTTTCTCNCNTCTCCAAANAGNCCNANNNGGNGATGTTTTTNGCTATCA
CNAACANANGNGCGGGGTTTNTTANCTCTNTCTGANNANNCCNCTCNCATTTTNACTATNCGGANNCCNANCCNAGAGGNGGNGGNG
NCACNCTGGGACTGATAACACGCCCCCGGGTNNATTGGAGGCCGAGAAAGGAATCTTCGGCAATGGANGAAAGTCTACCAANCAA
CNCCNCGCGAGNGAGGAAGGCCTTCGNGTCGNAATCTCTTTGTTNGNNAAAAAANANATACCNCTCGAACAGGGGGGACCTTANNGTT
CCTGAAAAAANCCACGNATAACTACGTGCCNCCNCCCGCGGNAATTANGGGGNGNGNACAAGCGTTTTCTNGAAAAATTATNGNGCCC
AAAAGCGCGCGGGGCGNTTNTTTTANGGNGTGGANGTGGAAAGCCNCCCGGNCCTCTNCCCGNGGGGNGNTCTTTTNTAANTTGGG
GNAACTTTNGGNTTNTGGGAGGAGNGAGTGGCAANTCCNNTGTTNTGGGGGTTCAAAATNCGTNAAATNTNTGGGGGNAACACCCNNGN
GGGGAAAGNCGGCTTTTTCTNCCCGGTAATAATNAANTTTTAGGNCGNGNAACCGNGGGGAGCAAAAAANAGGGAATAANGAANCCCTG
GAAACNCCNCCCCTNNAAACCANGGGGG

> I₃₂1-12 popravljen

CGNNGGTTGATCTGGCTAGTCACACCGGNCGTNNNTTTTCTCNGNNANACCCACCGCNGGNGNTNTTTATCCTGGNNAACNACCCCGNN
GGNNTTTTNTTTTCTTCNGNAANANNCCNCNCGGGGATANTTTTTCTCNCNTCTCCAAANAGNCCNANNNGGNGATGTTTTTNGCTATCA
CNAACANANGNGCGGGGTTTNTTATCTCTNTCTGANNACCNCCTCNCATTTTNACTATNCGGANNCCNANCCNAGAGGNGGNGGNG
NCACNCTGGGACTGATAACACGCCCCCGGGTNNATTGGAGGCCGAGAAAGGAATCTTCGGCAATGGANGAAAGTCTACCAANCAA
CNCCNCGCGAGNGAGGAAGGCCTTCGNGTCGAAAAATCTCTTTGTTNGNNAAAAAACACATACCGTTTCGAACAGGGGGGACCTTGANAGTT
CCTGAAAAAAGCCACGNATAACTACGTGCCACCCCGCGGGAATTANGGGGTGTGNACAAGCGTTTTCTCGAAAAATTATNGTGCCC
AAAAGCGCGCGGGGCGTTTCTTTTAAAGGTGTGGATGTGGAAAGCCNCCCGGCTCCTNCCCGTGGGAGAGCTCTTTTGTAAANTTGGG
GNAACTTTNGGTTTCTGGGAGGAGNGAGTGGCAATCCCATGTTGTGGGGGTTCAAAATGCGTAAATATNTGGGGGCAACACCCGCT
GGGGAAAGNCGGCTTTTTCTNCCCGGTAATAATNAANTTTTAGGNCGNGNAACCGTGGGGAGCAAAAAANAGGGAATAAGGAAACCCCTG
GAAACNCCNCCCCTNNAAACCANGGGGG

NCBI – BLAST (I₃₂1-12)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
AY543020.1	Brochothrix thermosphacta isolate MF 154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	5e-20	84%
AY524562.1	Uncultured bacterium clone Gly030-22A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	6e-19	84%
AF526922.2	Uncultured Enterococcus sp. clone T8-20 16S ribosomal RNA (rrn) gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AM411111.1	Enterococcus faecium partial 16S rRNA gene, strain CNRZ 149	11%	2e-14	81%
DQ847430.1	Enterococcus sp. HG11-061505 genomic sequence	11%	2e-14	81%
AY766432.1	Bacterium Zd23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AY483172.1	Uncultured bacterium clone KR13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AY692451.1	Enterococcus faecium strain SL2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	11%	2e-14	81%
AY256595.1	Uncultured bacterium DGGE band S2-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AF329121.1	Enterococcus faecalis A4M1744 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AF329120.1	Enterococcus faecalis A3M1730 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AF329119.1	Enterococcus faecalis A2AM 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AF329114.1	Enterococcus faecalis F21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AY946282.1	Enterococcus sp. 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	11%	2e-14	81%
AJ968579.1	Enterococcus faecium partial 16S rRNA gene, strain uc709	11%	2e-14	81%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂1-12)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM_PRO:AY433822	Bacillus sp. HPB-12 16S ribo	65.703	65.511	519
EM_PRO:CP000002	Bacillus licheniformis ATCC	68.129	68.129	433
EM_PRO:AE017333	Bacillus licheniformis DSM 1	68.129	68.129	433
EM_PRO:AE017333	Bacillus licheniformis DSM 1	68.129	68.129	433
EM_PRO:CP000002	Bacillus licheniformis ATCC	68.129	68.129	433
EM_PRO:CP000002	Bacillus licheniformis ATCC	67.898	67.898	433
EM_PRO:AE017333	Bacillus licheniformis DSM 1	67.898	67.898	433
EM_PRO:AE017333	Bacillus licheniformis DSM 1	67.898	67.898	433
EM_PRO:CP000002	Bacillus licheniformis ATCC	67.898	67.898	433
EM_PRO:CP000002	Bacillus licheniformis ATCC	67.898	67.898	433
EM_PRO:AE017333	Bacillus licheniformis DSM 1	67.898	67.898	433
EM_PRO:BA000004	Bacillus halodurans C-125 DN	67.840	67.840	426
EM_PRO:BA000004	Bacillus halodurans C-125 DN	67.840	67.840	426
EM_PRO:BA000004	Bacillus halodurans C-125 DN	67.431	67.431	436
EM_PRO:BA000004	Bacillus halodurans C-125 DN	67.606	67.606	426

Priloga A10: Sekvenca izolata I₃₂-5 in najbolj podobne sekvence v bazah podatkov NCBI in EBI

> I₃₂-5

GNGTTNNNGGGNTCGGNNNGGNGNTTATCNTTGGCANAGTNANGCGGGACTGTTAGAAGNTTTGTNTCCNGGTCTCANANCCACACNGCG
NGGTTNTNNNTTATCACNGTGGNCAACCCTCCCCTGCTNGGANTGNGNTAACNCCGGNAAANNGGGCCNANNAGGGGNGATAATTCTT
TCNTTCNCCATANNNGGNAATTNNNAGANGGCTCCCGCTNTCNCCTACNGANGGGCCNCGNGNAGNTTTATTCTATTNGGGGGGGNANGGTC
TCNCNAAGGNGACGATGNGNAGNCCNCCTGAGAGGGTGATNGCCACACTGNGACAGAGACACGCNCCCACACTCTTNTGGAGGGNGCA
GNGTNGAATCTTTTCAATGANCANAGTCTNNCGAGCAACGCCNCGTGAGNGAGNAAANACNTTTNNCGTCAAAAANTCTGTTGTNAG
NAAAAAANNGTCCNTNCAAAACANNGCNNTACCTTNNACNGTNACCTGAACNAAAAANCCCCGNNTAANTTTGTGCCAACCCGNCG
GNGGGNAATAANNTGNGGGGGGCAAGCNTTTTCCCGNAAANTTTTGGGGCGATAAAAGGGCNGCNCNCCGGGGGCGNGTNTNTTNTAAG
TCNTNGNGGGGTAAAAACCCCGCNGGCNCCNCCNTTTGGGGNGGTCNTCATTTTAAAAAACTNNGGGGGGGGANNTTGNAGTNTCTGG
GAAGAAGGGAGGGGNGGANATTTCCCNNTTGTNGTNGCGGGTANAAATGNCNTAAANATTNTTTTGGGAGGGNAACCNCCCGGNTGGGGA
NAANGGGNGTTTTNTCTTGGNCCANGTAA

> I₃₂-5 popravljen

GNGTTNNNGGGNTCGGNNNGGNGNTTATCNTTGGCANAGTNANGCGGGACTGTTAGAAGNTTTGTATCCNGGTCTCAGANCCACACNGCG
NGGTTNTNNNTTATCACNGTGGNCAACCCTCCCCTGCTNGGANTGNGTAAACNCCGGNAAAGNGGGCCNANNAGGGGNGATAATTCTT
TCNTTCNCCATANNNGGNAATTNNNAGANGGCTCCCGCTNTCNCCTACNGANGGGCCNCGNGNAGNTTTATTCTATTNGGGGGGGNANGGTC
TCNCNAAGGNGACGATGNGNAGNCCNCCTGAGAGGGTGATNGCCACACTGNGACAGAGACACGCNCCCACACTCTTNTGGAGGGNGCA
GTGTGAATCTTTTCAATGANCANAGTCTNNCGAGCAACGCCNCGTGAGNGAGNAAANACNTTTTCGCGTCAAAAAGCTCTGTTGTNAG
AAAAAATNGTCCTGCTNCAAAACANNGCNNTACCTTNNACNGTNACCTGAACNAAAAAGCCCCGNNTAANTTTGTGCCAACCCGCGC
GNGGGNAATAANGTAGGGGGGGCAAGCNTTTTCCCGNAAANTTTTGGGGCGATAAAAGGGCNGCNCNCCGGGGGCGNGTCTCTTNTAAG
TCNTNGNGGGGTAAAAACCCCGCNGGCNCCNCCNTTTGGGGNGGTCNTCATTTTAAAAAACTNNGGGGGGGGANNTTGNAGTNTCTGG
GAAGAAGGGAGGGGTGGANATTTCCCNNTTGTNGTNGCGGGTANAAATGNCNTAAANATTNTTTTGGGAGGGNAACCNCCCGGNTGGGGA
NAANGGGNGTTTTNTCTTGGNCCANGTAA

NCBI – BLAST (I₃₂-5)

Accession	Description	Query coverage	E value	Max ident
DQ465405.1	Bacillus decisiifrondis strain E5HC-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	13%	2e-13	77%

EBI – Fasta nucleotid (I₃₂-5)

DB:ID	Source	Identity %	Similar %	Overlap
EM PRO:DQ641932	Bacillus sp. RNS-2 16S ribos	65.703	65.703	519
EM PRO:DQ327713	Bacillus subtilis isolate Mz	61.628	61.483	688
EM PRO:DQ376935	Bacillus sp. L1a 16S ribosom	63.697	63.193	595
EM PRO:AY167821	Bacillus sp. SAFN-006 16S ri	68.511	68.511	470
EM PRO:DQ516997	Bacterium SL1.16 16S ribosom	68.298	68.298	470
EM PRO:DQ910849	Virgibacillus sp. SK1-3-11 1	63.566	63.566	516
EM PRO:DQ376938	Bacillus sp. L3 16S ribosoma	62.655	62.301	565
EM PRO:DQ448751	Bacillus sp. CNJ828 PL04 16S	67.872	67.872	470
EM PRO:AJ315075	Bacillus decolorationis 16S	67.872	67.872	470
EM PRO:DQ376910	Bacillus sp. 16R 16S ribosom	65.092	65.092	487
EM PRO:DQ448793	Bacillus sp. CNJ849 PL04 16S	67.660	67.660	470
EM PRO:X81130	Bacillus sp.(IV) 16S rRNA	65.605	65.605	471
EM PRO:AB195680	Halobacillus sp. IS-Hb7 gene	66.454	66.454	471
EM PRO:AJ316304	Bacillus decolorationis part	68.407	68.668	383
EM PRO:AY911055	Marine sediment bacterium IS	67.849	67.849	423

Priloga B: Kemijska sestava prahu za pripravo 1000 ml trdnega gojišča marine agar (MA),
za pripravo 1000 ml gojišča potrebujemo 55,1 g sestavine v prahu.

Difco™ Marine Agar 2216

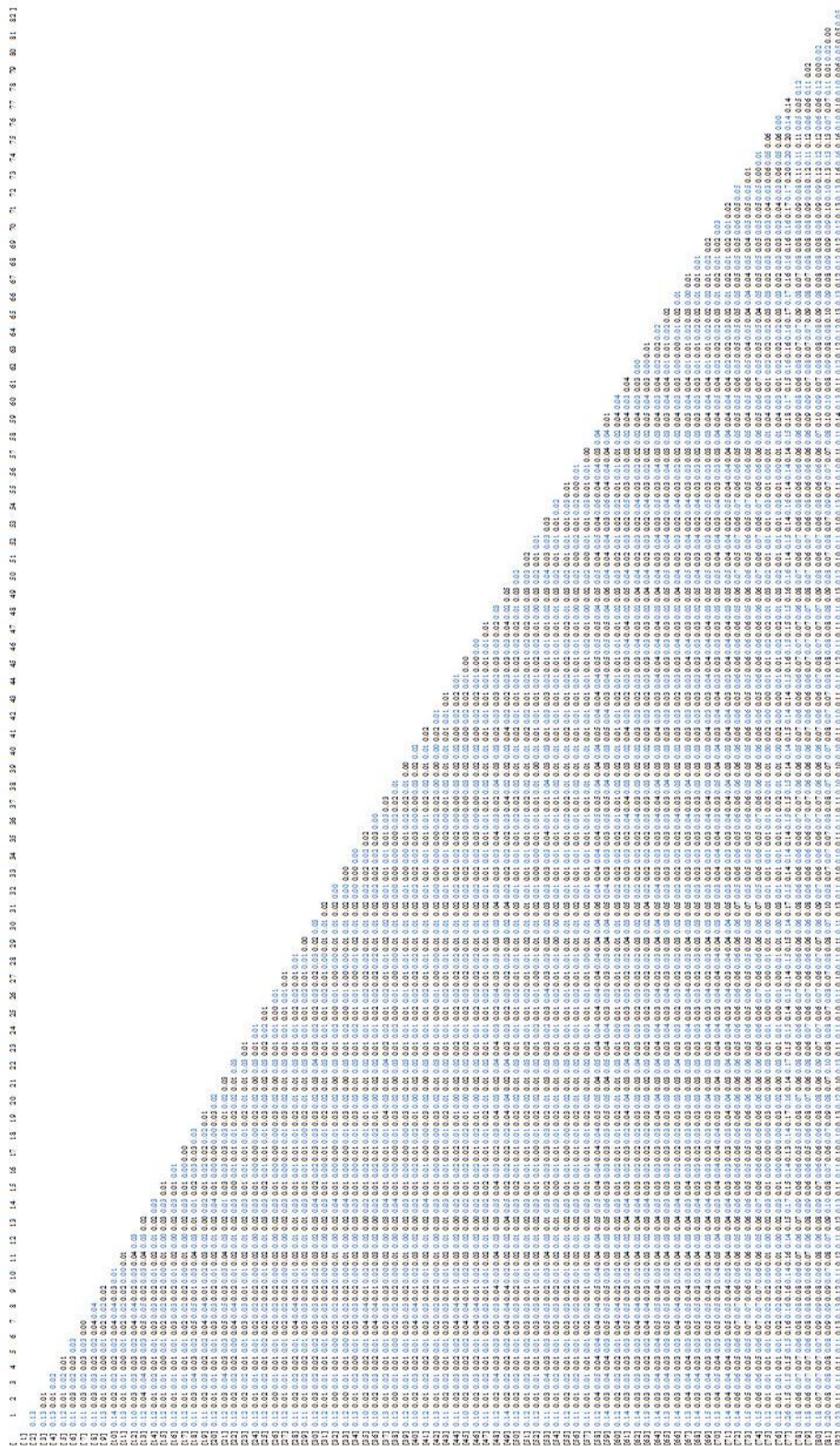
Approximate Formula* Per Liter

Peptone	5.0 g
Yeast Extract	1.0 g
Ferric Citrate	0.1 g
Sodium Chloride	19.45 g
Magnesium Chloride	8.8 g
Sodium Sulfate	3.24 g
Calcium Chloride	1.8 g
Potassium Chloride	0.55 g
Sodium Bicarbonate	0.16 g
Potassium Bromide	0.08 g
Strontium Chloride	34.0 mg
Boric Acid	22.0 mg
Sodium Silicate	4.0 mg
Sodium Fluoride	2.4 mg
Ammonium Nitrate	1.6 mg
Disodium Phosphate	8.0 mg
Agar	15.0 g

Priloga C: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskih dreves

Priloga C1: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa družine *Vibrionaceae*

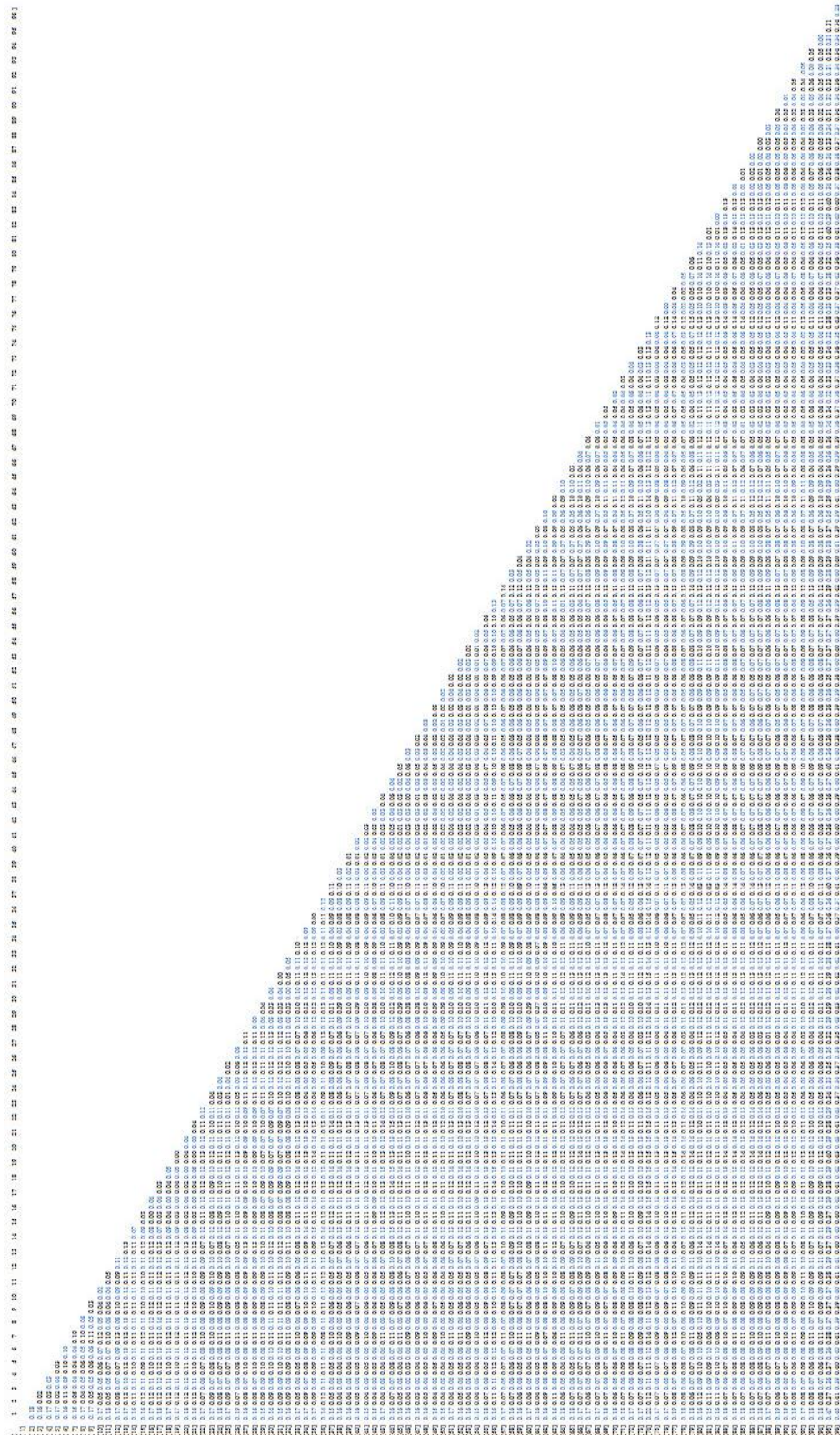
- | | |
|---|--|
| [1] #Pseudomonas_aeruginosa_(T)_X06684 | [42] #Vibrio_hepatarius_(T)_AJ345063 |
| [2] #Vibrio_cincinnatiensis_(T)_X74698 | [43] #Vibrio_fortis_(T)_AJ514916 |
| [3] #Vibrio_metschnikovii_(T)_X74711 | [44] #Vibrio_gigantis_(T)_AJ582810 |
| [4] #Vibrio_nereis_(T)_X74716 | [45] #Vibrio_tasmaniensis_(T)_AJ514912 |
| [5] #Vibrio_shilonii_(T)_AF007115 | [46] #Vibrio_crassostreae_(T)_AJ582808 |
| [6] #Vibrio_mimicus_(T)_X74713 | [47] #Vibrio_gallicus_(T)_AY257972 |
| [7] #Vibrio_cholerae_(T)_X74695 | [48] #Vibrio_rumoiensis_(T)_AB013297 |
| [8] #Vibrio_agarivorans_(T)_AJ310647 | [49] #Vibrio_ruber_(T)_AF462458 |
| [9] #Vibrio_fluvialis_(T)_X74703 | [50] #Vibrio_superstes_(T)_AY155585 |
| [10] #Vibrio_gazogenes_(T)_X74705 | [51] #Vibrio_hispanicus_(T)_AY254039 |
| [11] #Vibrio_tubiaschii_(T)_X74725 | [52] #Vibrio_scophthalmi_(T)_U46579 |
| [12] #Vibrio_lentus_(T)_AJ278881 | [53] #Vibrio_cyclitrophicus_(T)_U57919 |
| [13] #Vibrio_fischeri_(T)_X74702 | [54] #Vibrio_pacinii_(T)_AJ316194 |
| [14] #Vibrio_orientalis_(T)_X74719 | [55] #Vibrio_ponticus_(T)_AJ630103 |
| [15] #Vibrio_furnissii_(T)_X74704 | [56] #Vibrio_ezurae_(T)_AY426980 |
| [16] #Vibrio_natriegens_(T)_X74714 | [57] #Vibrio_haliotocoli_(T)_AB000390 |
| [17] #Listonella_pelagia_(T)_X74722 | [58] #Enterovibrio_coralii_(T)_AJ842343 |
| [18] #Vibrio_salmonicida_(T)_X70643 | [59] #Grimontia_hollisae_(T)_AJ514909 |
| [19] #Vibrio_splendidus_(T)_X74724 | [60] #Listonella_anguillicum_(T)_X16895 |
| [20] #Vibrio_harveyi_(T)_X74706 | [61] #Photobacterium_leiognathi_(T)_X74686 |
| [21] #Vibrio_wodanis_(T)_AJ132227 | [62] #Photobacterium_phosphoreum_(T)_X74687 |
| [22] #Vibrio_mediterranei_(T)_X74710 | [63] #Photobacterium_angustum_(T)_X74685 |
| [23] #Vibrio_ordalii_(T)_X74718 | [64] #Photobacterium_damselae_subsp._damsel... |
| [24] #Vibrio_diazotrophicus_(T)_X74701 | [65] #Photobacterium_frigidophilum_(T)_AY53... |
| [25] #Vibrio_navarrensis_(T)_X74715 | [66] #Photobacterium_iliopiscarium_(T)_AB00... |
| [26] #Vibrio_proteolyticus_(T)_X74723 | [67] #Photobacterium_indicum_(T)_AB016982 |
| [27] #Vibrio_vulnificus_(T)_X74726 | [68] #Photobacterium_aplysiae_(T)_AY781193 |
| [28] #Vibrio_tapetis_(T)_Y08430 | [69] #Photobacterium_eurosenbergii_(T)_AJ84... |
| [29] #Vibrio_aestuarianus_(T)_X74689 | [70] #Photobacterium_lipolyticum_(T)_AY554009 |
| [30] #Vibrio_pectenicida_(T)_Y13830 | [71] #Photobacterium_ganghwense_(T)_AY960847 |
| [31] #Vibrio_nigripulchritudo_(T)_X74717 | [72] #Salinivibrio_costicola_subsp._costico... |
| [32] #Vibrio_neptunius_(T)_AJ316171 | [73] #Salinivibrio_costicola_subsp._vallism... |
| [33] #Vibrio_brasiliensis_(T)_AJ316172 | [74] #Salinivibrio_costicola_subsp._alcalip... |
| [34] #Vibrio_xuui_(T)_AJ316181 | [75] #Vibrio_paraaemolyticus_(T)_X74720 |
| [35] #Vibrio_kanaloae_(T)_AJ316193 | [76] #Vibrio_alginolyticus_(T)_X74690 |
| [36] #Vibrio_chagasii_(T)_AJ316199 | [77] #MA6 |
| [37] #Vibrio_coralliilyticus_(T)_AJ440005 | [78] #MA7 |
| [38] #Allomonas_enterica_(T)_AJ550855 | [79] #MA8 |
| [39] #Vibrio_diabolicus_(T)_X99762 | [80] #MA9 |
| [40] #Vibrio_pomeroyi_(T)_AJ491290 | [81] #1/10MAgg2 |
| [41] #Vibrio_campbellii_(T)_X56575 | [82] #1/10MAgg3 |



Priloga C2: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa družine *Rhodobacteraceae*

- [1] #Rickettsia_rickettsii_(T)_L36217
- [2] #Rhodobacter_sphaeroides_(T)_X53853
- [3] #Rhodobacter_massiliensis_(T)_AF452106
- [4] #Rhodobacter_blasticus_(T)_D16429
- [5] #Rhodobacter_azotoformans_(T)_D70846
- [6] #Ahrensia_kielensis_(T)_D88524
- [7] #Albidovulum_inexpectatum_(T)_AF465833
- [8] #Amaricoccus_kaplicensis_(T)_U88041
- [9] #Amaricoccus_macauensis_(T)_U88042
- [10] #Amaricoccus_veronensis_(T)_U88043
- [11] #Amaricoccus_tamworthensis_(T)_U88044
- [12] #Antarctobacter_heliothermus_(T)_Y11552
- [13] #Hirschia_baltica_(T)_X52909
- [14] #Hyphomonas_jannaschiana_(T)_AJ227814
- [15] #Hyphomonas_polymorpha_(T)_AJ227813
- [16] #Hyphomonas_adhaerens_(T)_AF082790
- [17] #Hyphomonas_johnsonii_(T)_AF082791
- [18] #Hyphomonas_hirschiana_(T)_AF082794
- [19] #Hyphomonas_rosenbergii_(T)_AF082795
- [20] #Hyphomonas_oceanitis_(T)_AF082797
- [21] #Hyphomonas_neptunium_(T)_AF082798
- [22] #Jannaschia_helgolandensis_(T)_AJ438157
- [23] #Jannaschia_cystaugens_(T)_AB121782
- [24] #Jannaschia_seosinensis_(T)_AY906862
- [25] #Jannaschia_rubra_(T)_AJ748747
- [26] #Leisingera_methylohalidivorans_(T)_AY...
- [27] #Maricaulis_maris_(T)_AJ007807
- [28] #Maricaulis_maris_(T)_AJ007804
- [29] #Maricaulis_virginensis_(T)_AJ301667
- [30] #Maricaulis_salignorans_(T)_AJ227806
- [31] #Maricaulis_washingtonensis_(T)_AJ227804
- [32] #Maricaulis_parjimensis_(T)_AJ227808
- [33] #Methyloarcula_terricola_(T)_AF030436
- [34] #Octadecabacter_antarcticus_(T)_U14583
- [35] #Octadecabacter_arcticus_(T)_U73725
- [36] #Pannonibacter_phragmitetus_(T)_AJ400704
- [37] #Paracoccus_alkenifer_(T)_Y13827
- [38] #Paracoccus_denitrificans_(T)_Y16927
- [39] #Paracoccus_pantotrophus_(T)_Y16933
- [40] #Paracoccus_seriniphilus_(T)_AJ428275
- [41] #Paracoccus_solventivorans_(T)_Y07705
- [42] #Paracoccus_carotinifaciens_(T)_AB006899
- [43] #Paracoccus_kondratievae_(T)_AF250332
- [44] #Paracoccus_methylutens_(T)_AF250334
- [45] #Paracoccus_zeaxanthinifaciens_(T)_AF4...
- [46] #Paracoccus_haeundaensis_(T)_AY189743
- [47] #Paracoccus_yeei_(T)_AY014173
- [48] #Paracoccus_alcaliphilus_(T)_D32238
- [49] #Paracoccus_aminophilus_(T)_D32239
- [50] #Paracoccus_aminovorans_(T)_D32240
- [51] #Paracoccus_kocurii_(T)_D32241
- [52] #Paracoccus_thiocyanatus_(T)_D32242
- [53] #Paracoccus_versutus_(T)_D32243
- [54] #Paracoccus_koreensis_(T)_AB187584
- [55] #Rhodobaca_bogoriensis_(T)_AF248638
- [56] #Rhodothalassium_salexigens_(T)_D14431
- [57] #Rhodovulum_robiginosum_(T)_Y15012
- [58] #Rhodovulum_iodosum_(T)_Y15011
- [59] #Rhodovulum_strictum_(T)_D16419
- [60] #Rhodovulum_sulfidophilum_(T)_D16423
- [61] #Rhodovulum_marinum_(T)_AJ891122
- [62] #Roseibium_denhamense_(T)_D85832
- [63] #Roseibium_hamelinense_(T)_D85836
- [64] #Roseinatronobacter_thiooxidans_(T)_AF...
- [65] #Roseivivax_halodurans_(T)_D85829
- [66] #Roseivivax_halotolerans_(T)_D85831
- [67] #Roseobacter_litoralis_(T)_X78312
- [68] #Roseobacter_denitrificans_(T)_M96746
- [69] #Roseovarius_tolerans_(T)_Y11551
- [70] #Roseovarius_mucosus_(T)_AJ534215
- [71] #Roseovarius_nubinihibens_(T)_AF098495
- [72] #Roseovarius_crassostreae_(T)_AF114484
- [73] #Aquamarinicola_italica_(T)_AM904562
- [74] #Rubrimonas_cliftonensis_(T)_D85834
- [75] #Ruegeria_atlantica_D88526
- [76] #Ruegeria_atlantica_AB255399
- [77] #Sagittula_stellata_(T)_U58356
- [78] #Ruegeria_mobilis_AB255400
- [79] #Staleyia_guttiformis_(T)_Y16427
- [80] #Stappia_marina_(T)_AY628423
- [81] #Stappia_aggregata_(T)_D88520
- [82] #Stappia_alba_(T)_AJ878875
- [83] #Sulfitobacter_pontiacus_(T)_Y13155
- [84] #Sulfitobacter_brevis_(T)_Y16425
- [85] #Sulfitobacter_mediterraneus_(T)_Y17387
- [86] #Sulfitobacter_dubius_(T)_AY180102
- [87] #Sulfitobacter_delicatus_(T)_AY180103
- [88] #Phaeobacter_gallaeciensis_(T)_Y13244
- [89] #Ruegeria_aff._gelatinovorans_AJ295988
- [90] #Ruegeria_sp._AY258078
- [91] #Roseobacter_sp._AY646161
- [92] #Rhodobacteraceae_bacterium_AY145564
- [93] #Roseobacter_sp._AY745857
- [94] #Thalassococcus_halodurans_DQ397336
- [95] #MA2
- [96] #1/10MA

Nadaljevanje priloga C2: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa družine *Rhodobacteraceae*



Priloga C3: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa debla *Firmicutes*

- [1] #Clostridium_butyricum_X68177
- [2] #Lachnospira_multipara_L14719
- [3] #Peptostreptococcus_anaerobius_AY326462
- [4] #Eubacterium_limosum (T)_M59120
- [5] #Peptococcus_niger (T)_X55797
- [6] #Desulfotomaculum_luciaie (T)_AF069293
- [7] #Desulfotomaculum_solfataricum (T)_AY084
- [8] #Pelotomaculum_thermopropionicum (T)_AB0
- [9] #Cryptanaerobacter_phenolicus (T)_AY3272
- [10] #Hellobacterium_chlorum (T)_M11212
- [11] #Acidaminococcus_fermentans (T)_X65935
- [12] #Syntrophomonas_wolfeii_AF022248
- [13] #Halanaerobium_praevalens (T)_M59123
- [14] #Halobacteroides_halobius (T)_U32595
- [15] #Entomoplasma_lucivorax (T)_AF547212
- [16] #Spiroplasma_citri (T)_M23942
- [17] #Acholeplasma_laidlawii (T)_U14905
- [18] #Anaeroplasma_abactoclasticum (T)_M25050
- [19] #Erysipelothrix_rhusiopathiae (T)_M23728
- [20] #Bacillus_clausii (T)_X76440
- [21] #Bacillus_subtilis (T)_AJ276351
- [22] #Bacillus_barbaricus (T)_AJ422145
- [23] #Bacillus_drentensis (T)_AJ542506
- [24] #Bacillus_mannanilyticus (T)_AB043864
- [25] #Bacillus_coagulans (T)_D16267
- [26] #Bacillus_siralis (T)_AF071856
- [27] #Bacillus_mojavensis_AY030339
- [28] #Bacillus_decolorationis (T)_AJ315075
- [29] #Bacillus_patagoniensis (T)_AY258614
- [30] #Bacillus_arsenicus (T)_AJ606700
- [31] #Amphibacillus_xylanus_D82065
- [32] #Anoxybacillus_kamchatkensis (T)_DQ10025
- [33] #Exiguobacterium_aurantiacum (T)_X70316
- [34] #Filobacillus_milosensis (T)_AJ238042
- [35] #Geobacillus_stearothermophilus (T)_AJ29
- [36] #Geobacillus_toebii (T)_AF326278
- [37] #Gracilibacillus_halotolerans (T)_AF0369
- [38] #Gracilibacillus_orientalis (T)_AM040716
- [39] #Halobacillus_halophilus_X62174
- [40] #Lentibacillus_salicampi (T)_AB127980
- [41] #Marinibacillus_marinus (T)_AJ237708
- [42] #Ureibacillus_thermosphaericus (T)_X9064
- [43] #Virgibacillus_pantothenticus (T)_X60627
- [44] #Thalassobacillus_devorans (T)_AJ717299
- [45] #Bacillus_algicola_DQ001307
- [46] #Alicyclobacillus_acidocaldarius (T)_AB04
- [47] #Alicyclobacillus_vulcanalis (T)_AY425985
- [48] #Sulfobacillus_thermosulfidooxidans (T)_X
- [49] #Caryophanon_latum (T)_AJ491302
- [50] #Bacillus_silvestris (T)_AJ006086
- [51] #Listeria_monocytogenes (T)_X56153
- [52] #Brochothrix_thermosphacta (T)_M58798
- [53] #Paenibacillus_polymyxa_AJ223989
- [54] #Paenibacillus_koleovorans (T)_AB041720
- [55] #Paenibacillus_jamilae (T)_AJ271157
- [56] #Paenibacillus_naphthalenovorans (T)_AF3
- [57] #Paenibacillus_kribbensis (T)_AF391123
- [58] #Paenibacillus_daejeonensis (T)_AF391124
- [59] #Paenibacillus_brasiliensis (T)_AF273740
- [60] #Paenibacillus_alkaliterrae (T)_AY960748
- [61] #Paenibacillus_soli_DQ309072
- [62] #Ammoniphilus_oxalaticus (T)_Y14578
- [63] #Aneurinibacillus_aneurinilyticus (T)_D7
- [64] #Aneurinibacillus_terranovensis (T)_AJ71
- [65] #Thermicanus_aegyptius (T)_AJ242495
- [66] #Thermobacillus_xylanilyticus (T)_AJ0057
- [67] #Planococcus_citreus (T)_X62172
- [68] #Kurthia_zopfii_X7032
- [69] #Planomicrobium_koreense (T)_AF144750
- [70] #Sporosarcina_ureae (T)_AF202057
- [71] #Sporolactobacillus_inulinus (T)_M58838
- [72] #Marinococcus_halophilus (T)_X90835
- [73] #Staphylococcus_aureus_X68417
- [74] #Macrococcus_equipercicus_Y15712
- [75] #Salinicoccus_roseus (T)_X94559
- [76] #Thermoactinomyces_vulgaris (T)_AF138732
- [77] #Thermoactinomyces_dichotomicus (T)_A
- [78] #Planifilum_fimeticola (T)_AB088364
- [79] #Planifilum_fulgidum (T)_AB088362
- [80] #Planifilum_yunnanensis_DQ119659
- [81] #Turicibacter_sanguinis (T)_AF349724
- [82] #Bacillus_edaphicus (T)_AF006076
- [83] #Lactobacillus_equi_AB007908
- [84] #Lactobacillus_delbrueckii (T)_AB048833
- [85] #Aerococcus_viridans (T)_M58797
- [86] #Carnobacterium_divergens (T)_M58816
- [87] #Enterococcus_faecalis_AJ301831
- [88] #Enterococcus_hirae (T)_AJ276356
- [89] #Enterococcus_faecium (T)_AJ276355
- [90] #Enterococcus_durans (T)_AJ420801
- [91] #Enterococcus_mundtii (T)_AF061013
- [92] #Melissococcus_plutonius (T)_X75751
- [93] #Leuconostoc_mesenteroides (T)_M23035
- [94] #Streptococcus_pyogenes (T)_AB002521
- [95] #MA12popr
- [96] #1/10MA5popr
- [97] #Actinomyces_bovis (T)_X53224

Nadaljevanje priloga C3: Izračunane razdalje (Kimurin dvoparametrični model) za izris filogenetskega drevesa debla *Firmicutes*

