

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Monika PRIMON

**OPIS NEKATERIH FENOTIPSKIH LASTNOSTI IN  
PLAZMIDI BAKTERIJ IZOLIRANIH IZ PREBAVIL  
ČLOVEŠKE RIBICE (*Proteus anguinus*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Monika PRIMON

**OPIS NEKATERIH FENOTIPSKIH LASTNOSTI IN PLAZMIDI  
BAKTERIJ IZOLIRANIH IZ PREBAVIL ČLOVEŠKE RIBICE**  
*(Proteus anguinus)*

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DESCRIPTION OF SOME PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND  
PLASMIDS OF BACTERIA ISOLATED FROM INTESTINE OF OLM**  
*(Proteus anguinus)*

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za molekularno genetiko na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija biologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jernejo Ambrožič Avguštin in za recenzenta prof. dr. Miklavža Grabnarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Boris Bulog

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Miklavž Grabnar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora: 9. 9. 2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Monika Primon

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn  
DK 577.2.083:579.25:597.9(043.2)=163.6  
KG človeška ribica/mikrobiota prebavil/fenotipske lastnosti/plazmidi  
AV PRIMON, Monika  
SA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (mentorica)/GRABNAR, Miklavž (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2009  
IN OPIS NEKATERIH FENOTIPSKIH LASTNOSTI IN PLAZMIDI BAKTERIJ  
IZOLIRANIH IZ PREBAVIL ČLOVEŠKE RIBICE (*Proteus anguinus*)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XIII, 106 str., 17 pregл., 12 sl., 5 pril., 131 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Preučevane bakterijske seve smo izolirali iz različnih delov prebavil človeške ribice (*Proteus anguinus*). Identificirali smo jih z določanjem nukleotidnega zaporedja genov za 16S rRNA oz. na podlagi morfološke podobnosti z že identificiranimi sevi. Različni izolirani sevi so bili večinoma po Gramu negativni, od dvanajstih različnih rodov so prevladovali rodovi *Aeromonas*, *Shewanella*, *Serratia* in *Bacillus* skupine d. Največ bakterijskih kolonij in največje število različnih rodov je zraslo na ploščah z vzorci iz debelega črevesa. Pestrost znotraj najdenih rodov smo ugotavljali s pomočjo nekaterih fenotipskih lastnosti. Izolirani sevi so bili večinoma odporni proti večjemu številu različnih protimikrobnih učinkovin. Večinoma so rasli pri različnih testnih temperaturah, od 7°C do 37°C, razlikovala pa se je uspešnost njihove rasti. Hemolitično aktivnost smo potrdili pri sevih iz rodov *Aeromonas* in *Bacillus* skupine d. Rast na gojiščih s hitinom ali celulozo kot edinim virom ogljika pa pri večini sevov iz rodov *Aeromonas* in *Shewanella*, pri katerih se je razlikovala uspešnost rasti na posameznih gojiščih. Plazmidi so se večinoma pojavljali pri sevih iz rodov *Aeromonas* in *Shewanella*. Kloniranje manjših plazmidov in določanje njihovega zaporedja nam ni uspel. Prav tako nam ni uspel prenos plazmidov v *E.coli* s konjugacijo. Izolirani sevi niso producirali ESBL ali imeli zapise za te encime. Prav tako niso imeli determinant odpornosti proti kinolonom, *qnr* in *aac(6')-lb-cr*. Izoliran sev iz rodu *Shewanella* je zaviral rast seva iz rodu *Bacillus* skupine d, sev iz rodu *Alcaligenes* pa rast nedefinirane glive.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn

DC 577.2.083:579.25:597.9(043.2)=163.6

CX olm/microbes in intestine/phenotyp characteristics/plasmids

AU PRIMON, Monika

AA AMBROŽIČ AVGUŠTIN, Jerneja (supervisor)/GRABNAR, Miklavž (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2009

TI DESCRIPTION OF SOME PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND PLASMIDS  
OF BACTERIA ISOLATED FROM INTESTINE OF OLM (*Proteus anguinus*)

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XIII, 106 p., 17 tab., 12 fig., 5 ann., 131 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Investigated bacterial strains were isolated from different parts of olm's (*Proteus anguinus*) intestine. They were identified according to 16S rRNA sequence or through morphological resemblance to previously identified strains. The isolated strains were mostly Gram negative. The most abundant of twelve isolated genera were *Aeromonas*, *Shewanella*, *Serratia* and *Bacillus* group d. The highest abundance, determined by the number of bacterial colonies, and the highest diversity of the isolated genera were found on plates with samples from the large intestine. Diversity within identified genera was determined by some of their phenotypic characteristics. Isolated strains were mostly resistant to various antibiotics. They grew at different test temperatures, from 7 to 37°C, but with different growth efficiency. Hemolytic activity was confirmed for strains from genera *Aeromonas* and *Bacillus* group d. Growth on culture medium with chitin or cellulose as the only source of carbon was confirmed for the majority of strains from genera *Aeromonas* and *Shewanella*, but the growth efficiency differed between different growth media. Plasmids were detected predominantly in strains from genera *Aeromonas* and *Shewanella*. Cloning and sequencing of smaller plasmids was not successful. We also failed to transfer the plasmids into *E.coli* with conjugation. Isolated strains did not produce ESBL nor had genes for these enzymes. They did not possess quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-lb-cr*. Isolated strain from genus *Shewanella* repressed the growth of a strain from *Bacillus* group d and a strain from genus *Alcaligenes* repressed the growth of an unidentified fungus.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>X</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>XII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ČLOVEŠKA RIBICA ( <i>Proteus anguinus</i> ) .....	3
2.1.1 Podvrste.....	4
2.1.2 Zgodovina raziskav .....	4
2.1.3 Ogroženost in varstvo.....	5
2.2 JAME .....	6
2.2.1 Planinska jama.....	6
2.2.2 Bakterije v jamskih vodah.....	7
2.3 PREBAVILA ČLOVEŠKE RIBICE .....	8
2.3.1 Struktura prebavil repatih dvoživk.....	8
2.3.2 Razmere v prebavilih in prisotnost bakterij .....	9
2.3.3 Pomen bakterij v prebavilih .....	12
2.3.4 Mikrobiota v prebavilih žab .....	13
2.3.5 Mikrobiota v prebavilih rib .....	14
2.4 FENOTIPSKE LASTNOSTI BAKTERIJ .....	16
2.4.1 Hemolitična aktivnost .....	16
2.4.2 Razgradnja celuloze in hitina .....	16
2.4.3 Rast pri različnih temperaturah .....	17
<b>2.5 DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN IN MEHANIZMI ODPORNOSTI PROTI NJIM.....</b>	<b>17</b>
2.5.1 Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin .....	18
2.5.2 Mehanizmi bakterijske odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam .....	21
<b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>26</b>

3.1	MATERIAL .....	26
3.1.1	Človeška ribica ( <i>Proteus anguinlus</i> ) .....	26
3.1.2	Bakterijski sevi .....	26
3.1.3	Gojiča .....	26
3.1.4	Kemikalije .....	29
3.1.5	Pufri in reagenti .....	31
3.1.6	Kompleti in testi .....	33
3.1.7	Protimikrobnii diskii .....	33
3.1.8	Pribor in oprema .....	34
3.2	METODE .....	35
3.2.1	Izolacija bakterijskih sevov iz prebavila človeške ribice ( <i>Proteus anguinlus</i> ) .....	35
3.2.2	Preverjanje nekaterih fenotipskih lastnosti .....	36
3.2.3	Izolacija genomske DNA .....	38
3.2.4	Izolacija plazmidne DNA z alkalno hidrolizo .....	39
3.2.5	Agarozna gelska elektroforeza .....	40
3.2.6	Verižna rekcija s polimerazo (PCR) .....	41
3.2.7	Čiščenje s PCR pomnoženih fragmentov DNA .....	46
3.2.8	Restrikcija .....	46
3.2.9	Kloniranje .....	47
3.2.10	Iskanje klonov z rekombinantnimi plazmidi .....	49
3.2.11	Konjugacija .....	50
3.2.12	Identifikacija ESBL producirajočih sevov z difuzijsko metodo z diskii in E testi .....	51
3.2.13	E testi za moksifloksacin .....	51
3.2.14	Ugotavljanje povzročiteljev zaviranja rasti izoliranega seva iz rodu <i>Bacillus</i> skupine d .....	52
3.2.15	Ugotavljanje protiglivnega delovanja .....	52
3.2.16	Shranjevanje sevov .....	53
4	REZULTATI .....	54
4.1	PRISOTNOST RODOV BAKTERIJ V PREBAVILIH ČLOVEŠKE RIBICE .....	54
4.2	ŠTEVILO IZOLATOV IZ POSAMEZNIH RODOV GLEDE NA MESTO IZOLACIJE .....	56

<b>4.3 UGOTAVLJANJE PESTROSTI ZNOTRAJ POSAMEZNIH RODOV NA PODLAGI NEKATERIH FENOTIPSKIH LASTNOSTI .....</b>	<b>57</b>
4.3.1 Hemolitična aktivnost, rast na gojiščih z hitinom (H) ali karboksimetil celulozo (CMC) in pri različnih temperaturah .....	57
4.3.2 Odpornost proti protimikrobnim učinkovinam .....	64
<b>4.4 PRISOTNOST PLAZMIDOV V IZOLIRANIH SEVIH .....</b>	<b>73</b>
<b>4.5 KLONIRANJE .....</b>	<b>73</b>
<b>4.6 KONJUGACIJA .....</b>	<b>74</b>
<b>4.7 IDENTIFIKACIJA ESBL (BETA-LAKTAMAZE Z RAZŠIRJENIM SPEKTROM DELOVANJA) PRODUCIRajočIH SEVOV .....</b>	<b>74</b>
4.7.1 Identifikacija ESBL producirajočih sevov z difuzijsko metodo z diskri in Etestom .....	74
4.7.2 Pomnoževanje delov genov z začetnimi oligonukleotidi panCTX, TEM, SHV in DHA .....	75
<b>4.8 IDENTIFIKACIJA SEVOV S PLAZMIDNO KODIRANO ODPORNOSTJO PROTI KINOLONOM-PMQR .....</b>	<b>75</b>
4.8.1 Ugotavljanje prisotnosti delov genov <i>qnr</i> .....	75
4.8.2 Ugotavljanje prisotnosti delov genov <i>aac(6')-Ib</i> in <i>aac(6')-Ib-cr</i> .....	76
<b>4.9 E TESTI ZA MOKSIFLOKSACIN .....</b>	<b>76</b>
<b>4.10 UGOTAVLJANJE POVZROČITELJEV ZAVIRANJA RASTI IZOLIRANEGA SEVA IZ RODU <i>BACILLUS</i> SKUPINE D .....</b>	<b>76</b>
<b>4.11 UGOTAVLJANJE PROTIGLIVNEGA DELOVANJA .....</b>	<b>76</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>78</b>
<b>5.1 RAZPRAVA .....</b>	<b>78</b>
5.1.1 Fenotipske lastnosti .....	80
5.1.2 Prisotnost plazmidov v izoliranih sevih .....	85
5.1.3 Konjugacija .....	86
5.1.4 Identifikacija ESBL producirajočih sevov .....	87
5.1.5 Identifikacija sevov s plazmidno kodirano odpornostjo proti kinolonom (QNR) .....	87
5.1.6 E test za moksifloksacin .....	88
5.1.7 Zaviranje rasti izoliranega seva iz rodu <i>Bacillus</i> skupine d .....	88
5.1.8 Protiglivno delovanja seva iz rodu <i>Alcaligenes</i> .....	89
5.1.9 Možni viri diverzitete bakterijskih rodov v prebavilih močerila .....	89

5.2	SKLEPI .....	91
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>95</b>
ZAHVALA		
PRILOGE		

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Najpogostejsi rodovi po Gramu negativnih bakterij, ki so jih do sedaj izolirali iz prebavil rib.	15
Preglednica 2. Razlicne koncentracije gojišča LB.	27
Preglednica 3. Založne in končne koncentracije protimikrobnih učinkovin v gojišču LB.	27
Preglednica 4. Uporabljeni diskri prepojeni s protimikrobnimi učinkovinami določene koncentracije.	33
Preglednica 5. Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri verižni reakciji s polimerazo, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost pomnožka, ki nastane pri PCR.	42
Preglednica 6. Rodovi, izolirani iz prebavil človeške ribice ( <i>Proteus anguinus</i> ) in njihova uvrstitev.	55
Preglednica 7. Razporeditev izolatov iz posameznih rodov glede na mesto izolacije.	56
Preglednica 8. Rast izoliranih sevov iz rodu <i>Aeromonas</i> na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.	58
Preglednica 9. Rast izoliranih sevov iz rodu <i>Shewanella</i> na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.	60
Preglednica 10. Rast izoliranih sevov iz rodu <i>Serratia</i> na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.	62
Preglednica 11. Rast izoliranih sevov iz rodu <i>Bacillus</i> skupine d na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.	63
Preglednica 12. Rast izoliranih sevov iz ostalih rodov na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.	64
Preglednica 13. Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu <i>Aeromonas</i> .	65
Preglednica 14. Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu <i>Shewanella</i> .	67
Preglednica 15. Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu <i>Serratia</i> .	69
Preglednica 16. Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu <i>Bacillus</i> skupine d.	71
Preglednica 17. Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz ostalih rodov.	72

## KAZALO SLIK

Slika 1. Jame po Sloveniji. Pod številko 7 je označena Planinska jama, kjer smo izlovili človeško ribico za našo raziskavo.....	7
Slika 2. Prebavila krastače na levi in tigrastega aksolotla na desni; zgoraj desno se prebavila obeh vrst začnejo z želodcem, sledita tanko in debelo črevo.....	9
Slika 3. Razdelitev prebavil pri človeku.....	11
Slika 4. Vzorčenje z različnih predelov prebavil močerila.....	35
Slika 5. Shematski prikaz razmaza sevov na isto ploščo gojišča LB pri preverjanju vpliva drugih sevov na rast seva Bd1 iz rodu <i>Bacillus</i> skupine d.....	52
Slika 6. Shematski prikaz razmaza sevov in nedefinirane glive na isto ploščo gojišča LB pri preverjanju vpliva sevov na rast glive.....	53
Slika 7. Izolirana genomska DNA iz seva Pa iz rodu <i>Paenibacillus</i> , ki je rasel pri temperaturi 19°C in 37°C.....	54
Slika 8. Primer odpornosti proti ampicilinu (levo), intermediarne odpornosti proti ciprofloksacinu (zgoraj) ter občutljivosti za tetraciklin (desno) pri sevu A4 iz rodu <i>Aeromons</i> - difuzijska metoda z diskri.....	66
Slika 9. Dva »majhna« plazmida izolirana iz seva S4 iz rodu <i>Shewanella</i> .....	68
Slika 10. Primer odpornosti proti cefotaksimu pri sevu Sr5 (28b) iz rodu <i>Serratia</i> - rast seva na gojišču LB z dodanim cefotaksimom.....	70
Slika 11. Primer E testa, s katerim smo ugotavljali MIC za cefotaksim (CT) in cefotaksim z klavulansko kislino (CTL), pri sevu S2 iz rodu <i>Shewanella</i> .....	75
Slika 12. Primer protiglivnega delovanja. Na sredini plošče je razmazana gliva, prečno 3-4 mm od le-te proti robu plošče pa posamezni sevi z prvotne plošče – Al2 (29a.1) in Bd1 (29a.2). .....	77

## KAZALO PRILOG

**Priloga A** Sekvence pomnoženih delov genov za 16S rRNA

**Priloga B** Sekvence pomnoženih delov genov qnr

**Priloga C** Sekvence pomnoženih delov genov z primerji SHV

**Priloga D** Minimalne inhibitorne koncentracije za moksifloksacin

**Priloga E** Dovoljenje za izlov človeške ribice (*Proteus anguinus*), Ministrstvo za okolje,  
prostor in energijo Republike Slovenije

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- 16S rRNA.. RNA v 30s ribosimski podenoti  
AM.....ampicilin  
Az.....natrijev azid  
AZM..... azitromicin  
BAB.....gojišče krvni agar – "blood agar-based"  
BHI.....gojišče "brain heart infusion"  
bp.....bazni par  
CAZ....ceftazidim  
ccc.....superzavita, navita oblika krožne dvoverižne DNA (covalently closed circle)  
CIP.....ciprofloksacin  
CLSI.....Clinical and Laboratory Standards Institute  
C .....kloramfenikol  
CT.....cefotaksim  
CXM.... cefuroksim  
CTAB.....detergent cetil-trimetil-amonijev bromid  
DNA.....deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)  
EDTA....etilendiamintetraocetna kislina  
E.....eritromicin  
ESBL.....beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (extended-spectrum  $\beta$ -lactamases)  
EtBr.....etidijev bromid  
GM.....gentamicin  
IPM..... imipenem  
kb.....kilobaza  
LB.....gojišče Luria-Bertani  
MH.....gojišče Muller-Hinton  
NaCl.....natrijev klorid  
MIC.....minimalna inhibitorna koncentracija (minimal inhibitory concentration)  
PBP.....penicilin vezajoči proteini (penicillin binding proteins)  
PCR.....verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)  
rDNA.....DNA, ki kodira gene za rRNA  
RNA.....ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)

- RNAza.....encim, ki cepi molekule RNA  
S.....streptomycin  
SDS.....natrijev dodecilsulfat (sodium dodecyl sulphate)  
STET.....pufer iz saharoze, tritona X-100, EDTA, Tris HCl  
TBE.....Tris-boratni elektroforezni pufer  
TC.....tetraciklin  
TE.....Tris-EDTA  
TMP.....trimetoprim  
UV.....ultravijolična (svetloba)

## 1 UVOD

Človeška ribica (*Proteus anguinus*) je največja jamska žival na svetu ter edini jamski vretenčar v Evropi. Živi v podzemnih vodah Dinaridov, v kraškem okolju, z mirnimi, dobro prezračenimi vodami in stabilno, nizko temperaturo vode. Preživetje v vodi ji zagotavlja škrge, ki so ena izmed lastnosti ličink, ki jih ohrani tudi v odraslem stanju. Na jamsko okolje brez svetlobe, z nizkimi temperaturami in majhno količino hrane se je prilagodila z številnimi troglomorfnimi značilnostmi, kot so posebna čutila in odpornost na stradanje. Poznamo dve podvrsti, *Proteus anguinus anguinus*, z mikrobioto katere smo se ukvarjali tekom naših raziskav, in *Proteus anguinus parkelj*, ki je belokranjski endemit.

Čeprav je o biologiji in funkcionalni morfologiji človeške ribice na razpolago kar precej podatkov, je mikrobiota prebavil tega organizma še popolna neznanka. Prav mikrobiota pa je, sodeč po množici nedavno objavljenih člankov, ključna za »normalno« rast in razvoj ter fiziologijo organizma. Mikrobiota vpliva na številne biološke procese, prehrano in prebavo organizma, regulira izražanje genov in sposobnost razstrupljanja snovi iz okolja.

Mikrobioto lahko proučujemo z izoliranjem celokupne metagenomske DNA. Z verižno reakcijo s polimerazo pomnožimo gene za 16S rRNA in jih s kloniranjem vnesemo v druge seve. Pri tem dobimo večje število kopij želenih genov oz. njihovih delov, kar nam omogoča lažjo določitev njihovega zaporedja nukleotidov. Na ta način lahko identificiramo večino prisotnih bakterij. Preučevanja se lahko lotimo tudi na t. i. klasičen način, in sicer z gojenjem sevov na različnih gojiščih, pri čemer lahko določimo njihove mikrobiološke in genetske lastnosti.

### 1.1 NAMEN DELA

V okviru diplomskega dela smo želeli preučiti sestavo mikrobiote prebavil žrtvovane človeške ribice iz Planinske jame z gojenjem na različnih gojiščih. Če imamo bakterije nagojene, lahko z različnimi genetskimi in mikrobiološkimi metodami o posameznih sevih oz. rodovih izvemo več, kot če bi seve, na podlagi izolirane 16S rDNA iz celokupne metagenomske DNA, le določili do vrste.

Najprej smo skušali ugotovit kateri rodovi se pojavljajo v prebavilih močerila. Da pa bi o izoliranih sevih izvedeli kar največ, smo pri njih preverili izbrane fenotipske lastnosti, in sicer hemolitično aktivnost na ploščah krvnega agarja, sposobnost razgradnje hitina ali celuloze, rast pri različnih temperaturah in odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Na podlagi teh lastnosti smo ugotavliali pestrost znotraj posameznih rodov. Pri izbranih sevih smo skušali izolirati plazmide, ki omogočajo horizontalen prenos genov v populaciji bakterij. Z njimi se prenašajo tudi odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam, ki so zaradi velikega širjenja med bakterijami znotraj iste vrste, med njimi in celo med bakterijami iz različnih rodov še posebej aktualne.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ČLOVEŠKA RIBICA (*Proteus anguinus*)

Človeška ribica, tudi močeril ali proteus (*Proteus anguinus*), živi v podzemnih sladkovodnih biotopih Dinarskega krasa, od porečja reke Soče pri Trstu v Italiji, prek južne Slovenije in jugozahodne Hrvaške do Hercegovine. Uvrščamo jo med dvoživke (Amphibia), in sicer med repate krkone (Urodela) in v družino močerilarjev (Proteidae) (Culver, 2005; [http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

Je edina vrsta evropskih jamskih repatih dvoživk in najbolj omembe vreden troglobiont podzemnih voda, v katerih preživi celotno življenje (Bulog in sod., 2000). Je dinarski endemit, kar pomeni, da je njegova razširjenost omejena na Dinarski kras. Obenem je relikt, ostanek favne, ki je v preteklosti naseljevala širše območje

([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)). Živi v sveži oksigenirani vodi s temperaturo od 4-14°C, pojavlja se tudi na majhnih, poplavnih območjih na mejah podzemnih rek (Culver, 2005) .

Proteus je jeguljaste oblike, njegova dolžina lahko doseže tudi 40 cm, njegova teža pa je pri starosti štirideset let nekaj deset gramov. Živi lahko do 80 let (Culver, 2005). Ustna odprtina proteusa je majhna, v ustih pa ima drobne zobe, nameščene kot rešeto, ki zadržuje večje delce. Spolno dozori šele pri 14 letih, ličinke pa postanejo po obliku podobne odraslim živalim po skoraj štirih mesecih ([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

Za razvoj človeške ribice je značilna heterokronija oz. pedomorfost, pri kateri, kljub temu da do preobrazbe ne pride, osebek spolno dozori in vse življenje ohrani nekatere juvenilne znake ličink. Pri proteusu se ta pojav izraža kot neotenija – upočasnjeni somatski razvoj ob normalnem razvoju gonad. Pri odraseljem osebku se ohranijo zunanje škrge, škržne reže in koža z mnogimi značilnostmi ličinke

([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

Za človeško ribico so značilne nekatere splošne troglomorfne značilnosti, kot so zakrnela oči, depigmentirana kože, specializirani senzorični organi, podaljšani posamezni telesni deli, še posebej asimetrično podaljšana glava, počasen metabolizem in majhna potreba po hrani, odpornost na stradanje ter dolga življenjska doba (Bulog in sod., 2000; Culver, 2005). Ima tudi majhno število potomcev, kar je še ena od bioloških prilagoditev na podzemlje (Culver,

2005; [http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)). Odpornost na stradanje, ki je prilagoditev na pomanjkanje hrane v jamah, omogoča zmožnost zaužitja večje količine hrane naenkrat in shranjevanje hranilnih snovi v obliki večjih količin lipidov ter glikogena v jetrih, pa tudi v skeletnih mišicah in maščobnem tkivu repa (Bizjak-Mali, 2002; Herzog, 2004). Ob pomanjkanju hrane pride do reducirane aktivnosti in zmanjšane stopnje metabolizma

([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

V svojem naravnem okolju je predator, ki se večinoma prehranjuje z raki in polži, poleti pa tudi z insekti. Njegova prehrana naj bi se razlikovala glede na sezono (Bulog in sod., 2000). Hrane ne žveči, temveč požira celo

([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

### **2.1.1 Podvrste**

Poznamo podvrsto *Proteus anguinus anguinus* Laurenti 1768, ki ima telo rožnate barve in majhne oči prekrite s kožo, in podvrsto *Proteus anguinus parkelj* Sket&Arntzen 1994, ki ima telo črnosive barve in majhne, dobro vidne oči, ki jih koža ne prekriva (Veenvliet in Kus Veenvlier, 2003; Culver 2005). Slednja živi le v podzemlju v ožji okolici Črnomlja in je belokranjski endemit ([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

V okviru naših raziskav smo se ukvarjali z mikrobioto podvrste *Proteus anguinus anguinus* Laurenti 1768.

### **2.1.2 Zgodovina raziskav**

Človeško ribico je prvi omenil že Janez Vajkard Valvasor v *Slavi vojvodine Kranjske* (1689), znanstveni opis pa je naredil Joseph Nicolai Laurenti leta 1768. V svojem delu »*O nastanku vrst z naravnim izborom ali ohranjanje boljših pasem za obstanek*« (1859) jo je omenil tudi Charles Darwin. Danes se s človeško ribico ukvarjajo tako na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete kot tudi v številnih drugih laboratorijih po svetu

([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

Dosedanje študije človeške ribice so zajemale funkcionalno morfološke raziskave prebavnega sistema, raziskave čutilnih organov kot so oktavolateralni, fotoreceptorni in kemoreceptorni

čutilni sistem ter raziskave pinealnega organa. Raziskovali so tudi mehanizme zemeljske magnetne orientacije in koncentracije kovin v tkivih (Bulog in sod., 2000).

Čeprav je o človeški ribici tako o biologiji kot funkcionalni morfologiji na razpolago kar precej podatkov, ostaja mikrobiota v prebavilih tega organizma še neraziskana. Prav mikrobiota pa je pomembna za razvoj organizma, njegovo fiziologijo in potek številnih bioloških procesov. Zaradi pomanjkanja podatkov o mikrobioti v prebavilih človeške ribice smo se pri zbiranju podatkov osredotočili na najbližje sorodnike, od katerih je bilo največ raziskav narejenih na žabah. Prav tako smo kljub ne najožji sorodnosti pregledali tudi objave pri ribah, saj so te prav tako kot človeška ribica vodne ektotermne živali, kjer je možen vir bakterij sam vodni habitat.

### 2.1.3 Ogroženost in varstvo

Človeška ribica je prilagojena na jamsko življenje, kjer najde ustrezne pogoje za preživetje. Onesnaženje njenega življenjskega prostora je zanjo lahko usodno, še posebej zaradi njene dolgoživosti ([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

Na ravni Evropske unije za človeško ribico velja Direktiva o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih rastlinskih in živalskih vrst. Odvzem ali zadrževanje osebkov sta dovoljena le pod strogo nadzoranimi pogoji in v omejenem številu, ki ga določijo pristojni državni organi. Pri delu z osebki te vrste veljajo predpisi iz Pravilnika o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst. Človeško ribico uvrščamo na rdeči seznam, njene habitate pa v slovenski del omrežja Nature 2000 ([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)).

K polnjenju kraških vodnih rezervoarjev in vnašanju polutantov veliko prispevajo ponikajoči površinski vodotoki, ki so zelo občutljivi na kakršno koli onesnaženje. Med suho sezono površinski vodotoki pogosto izginejo, v podzemeljskih vodah pa ostanejo visoke koncentracije polutantov. Čeprav je podzemeljsko vodno omrežje mrežasto, kar daje večje možnosti za razredčenje polutantov, pa to dejstvo hkrati omogoča večje razširjenje onesnaženja z enega žarišča (Sket in Velkovrh, 1981).

Z industrijsko in komunalno onesnaženimi vodami prihajajo v podzemlje strupene in nevarne snovi, kot so umetna gnojila, pesticidi, kovine in drugi onesnaževalci

([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)). Večinoma gre za kemijske onesnaževalce, ki se le počasi, če sploh, razgrajujejo z naravnimi procesi. Te snovi so za živa bitja zelo toksične, če se akumulirajo v večjih količinah (Bulog in sod., 2000). Za obstanek življenja v vodotoku niso pomembne le povprečne koncentracije posameznih onesnaževalcev, ampak tudi vrednosti najnižjih in najvišjih koncentracij (Sket in Velkovrh, 1981).

## 2.2 JAME

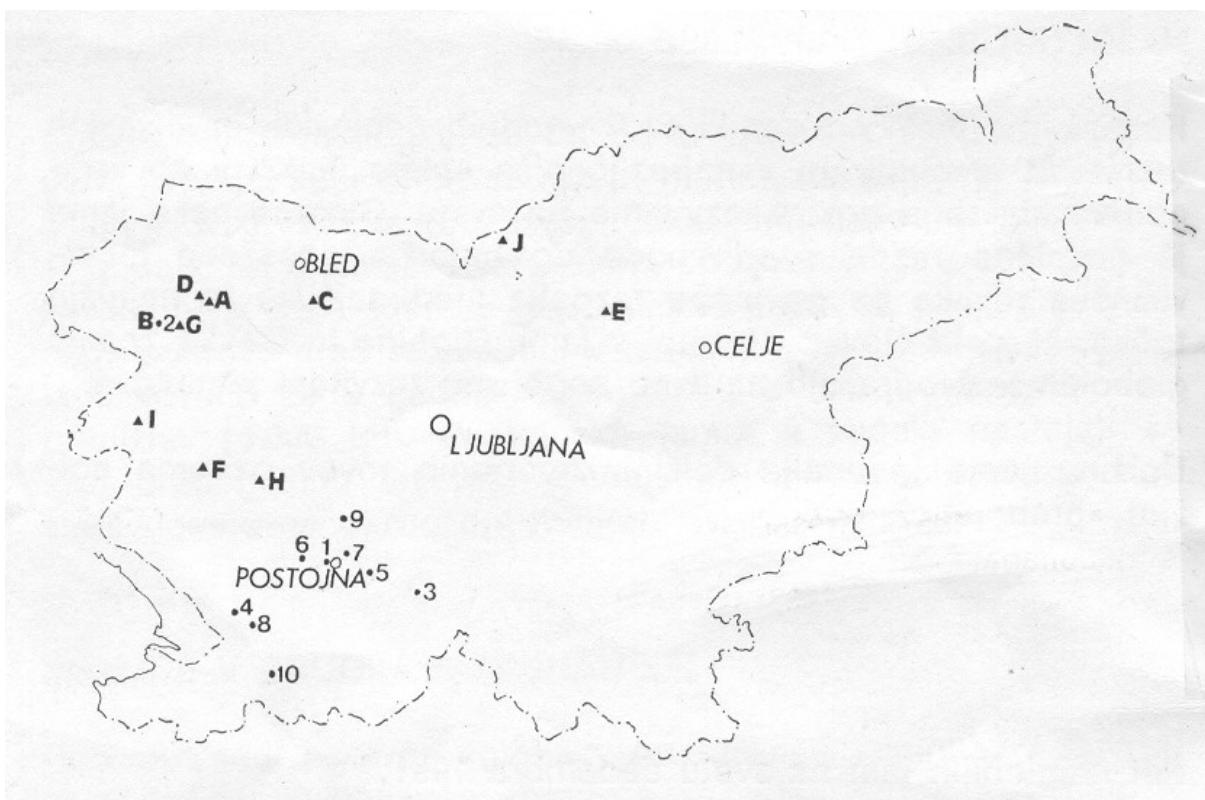
V jamah se pojavljajo specifične živiljenjske razmere, kot so tema, visoka vlažnost, relativno nizka in stalna temperatura ter skoraj nevtralen pH vode (Laiz in sod., 1999). K ekstremnosti jamskih okolji dodatno prispeva majhna količina hrane. Zaradi oligotrofnosti so organizmi v jamah izpostavljeni stradanju (Laiz in sod., 1999;

<http://quest.nasa.gov/projects/spacewardbound/docs/lifeincaves.pdf>.

Za jame je značilno znižanje onesnaženja z organskimi snovmi v začetnih delih podzemeljskega toka. Verjetno je podzemeljska struga naseljena z dovolj pestro množico bakterij, ki lahko razgradi kakršnakoli organsko snov. Vsebnost nitratov pa se tekom podzemeljskega toka poveča (Sket in Velkovrh, 1986).

### 2.2.1 Planinska jama

Osebek, ki smo ga študovali za raziskovalno delo te diplomske naloge in drugih raziskav, smo izlovili v Planinski jami. Ta jama je del Postojnsko-Planinskega jamskega sistema, ki leži 25km severovzhodno od klasičnega kraškega območja. Jama je dolga 6.656 km, globoka 65m in povezana s Postojnsko jamo. V Planinskem jamskem sistemu se reka Pivka, ki teče tudi skozi Postojnsko jamo, združi z reko Rak in se pojavi kot reka Unica na vhodu v Planinsko jamo. Večina prehodov v Planinski jami je aktivnih vodnih kanalov s posameznimi dvignjenimi suhimi območji (Culver, 2005).



Slika 1. Jame po Sloveniji. Pod številko 7 je označena Planinska jama, kjer smo izlovili človeško ribico za našo raziskavo.

### 2.2.2 Bakterije v jamskih vodah

Nekateri avtorji navajajo, da so izolati iz vodnih vzorcev jam, ki jih je bilo možno gojiti, večinoma vsebovali po Gramu negativne bakterije (72,7 %). Med njimi so najpogosteje izolirali proteobakterije (Ikner in sod., 2006; Macalady in sod., 2006; <http://quest.nasa.gov/projects/spacewardbound/docs/lifeincaves.pdf>) in aktinobaterije (<http://quest.nasa.gov/projects/spacewardbound/docs/lifeincaves.pdf>; Ikner in sod., 2006). Po biomasi so prevladovali predstavniki rodov *Beggiatoa* in *Thiothrix*, ki spadata med  $\gamma$  proteobakterije (Macalady in sod., 2006).

V objavah smo zasledili, da so iz kapljajoče vode pogosto izolirali predstavnike rodu *Aeromonas*, ki se prav tako pojavljajo v sladkih in odpadnih vodah. Izolirali so tudi predstavnike rodu *Acinetobacter*, ki je že bil najden v podzemnih vodah globokih jam. Številčno je bil pomemben tudi rod *Enterobacter*, ki ima v naravi široko razširjenost in se pojavlja v sladkih in odpadnih vodah ter živalskih in človeških iztrebkih. Našli so tudi vrste *Serratia liquefaciens*, *Chromobacter violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, predstavnike rodu *Pseudomonas* in druge (Ikner in sod., 2006).

Iz jam izolirane po Gramu pozitivne bakterije, ki so jih lahko gojili, so pripadale deblu Firmicutes (Ikner in sod., 2006;

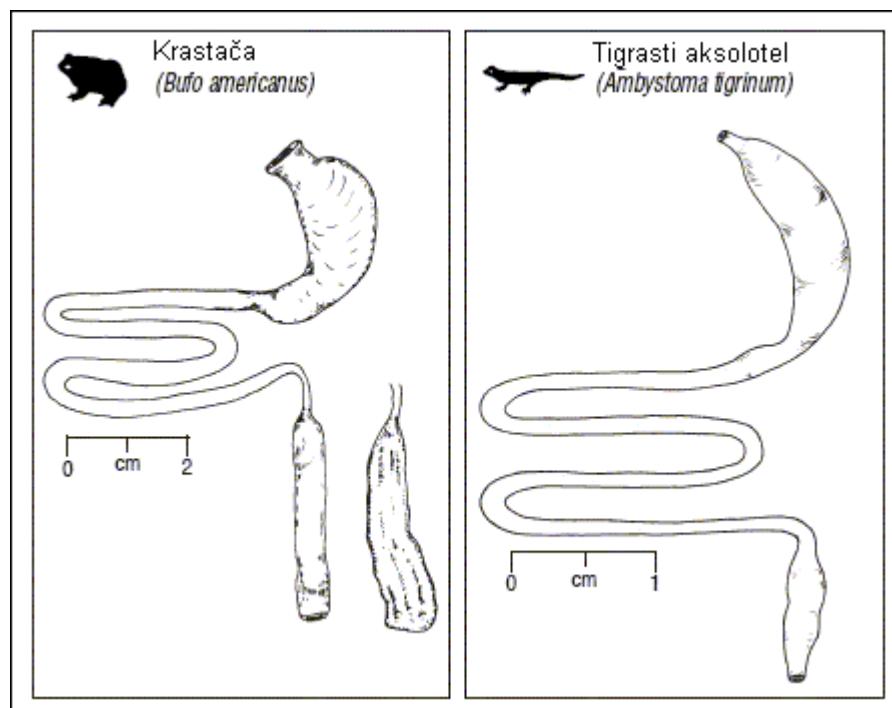
<http://quest.nasa.gov/projects/spacewardbound/docs/lifeincaves.pdf>). Iz kapljajoče jamske vode so izolirali predstavnike rodu *Bacillus*, ki spada v omenjeno deblo (Laiz in sod., 1999).

Pri raziskavah slovenskih jam je le malo znanega o prisotnih mikroorganizmih, tako na površinah sten in tal jam kot v jamski vodi. V Škocjanskih jamah so v predelih, kjer stalno kaplja voda, našli nizek delež po Gramu pozitivnih bakterij, več pa je bilo predstnikov po Gramu negativnih bakterij iz družin *Enterobacteriaceae* in *Vibronaceae* (Mulec, 2008).

## 2.3 PREBAVILA ČLOVEŠKE RIBICE

### 2.3.1 Struktura prebavil repatih dvoživk

Pri močerilu je bila raziskana osnovna morfologija prebavnega trakta, s poudarkom na ultrastrukturnih spremembah celic epitela želodca in anteriornega dela črevesa tekom daljšega obdobja stradanja (Bizjak-Mali, 1995). Osnovna anatomska in histološka zgradba prebavnega trakta močerila je primerljiva z zgradbo prebavnega trakta pri ostalih dvoživkah in ribah kostnicah (sl.) Tako kot pri večini dvoživk je prebavna cev močerila razdeljena na kratek poziralnik, nekoliko razširjen želodec, kratek dvanajsternik, srednje dolgo tanko črevo in kratek odsek debelega črevesa, ki se odpira v stok ali kloako. Prebavna cev je brez slepih priveskov ali cekumov.



**Slika 2.** Prebavila krastače na levi in tigrastega aksolotla na desni; zgoraj desno se prebavila obeh vrst začnejo z želodcem, sledita tanko in debelo črevo.

Za razliko od brezrepcev ostaja osnovna struktura prebavnega trakta repatih dvoživk pri odraslih bolj ali manj enaka kot pri larvah (Duellman in Trueb, 1992). Z metamorfozo se prebavni trakt nekoliko skrajša, stena se odebeli, postopoma se razvijejo gastrične žleze, ki se pojavijo najprej v pilorični in kasneje v kardialni regiji.

### 2.3.2 Razmere v prebavilih in prisotnost bakterij

Pri močerilu in dvoživkah na splošno obstajajo le podatki o strukturi prebavil, delovanju encimov in izločkov celic, ki sestavljajo steno (Bizjak, 1995; Bulog in sod., 2002) ne pa tudi o pogojih, ki se pojavljajo v prebavilih in lahko potencialno vplivajo na pojavljanje in razporeditev bakterij v posameznih predelih. Zato bom zaradi lažje predstave navedla podatke o prebavilih človeka kot predstavnika vretenčarjev, kamor spada tudi človeška ribica.

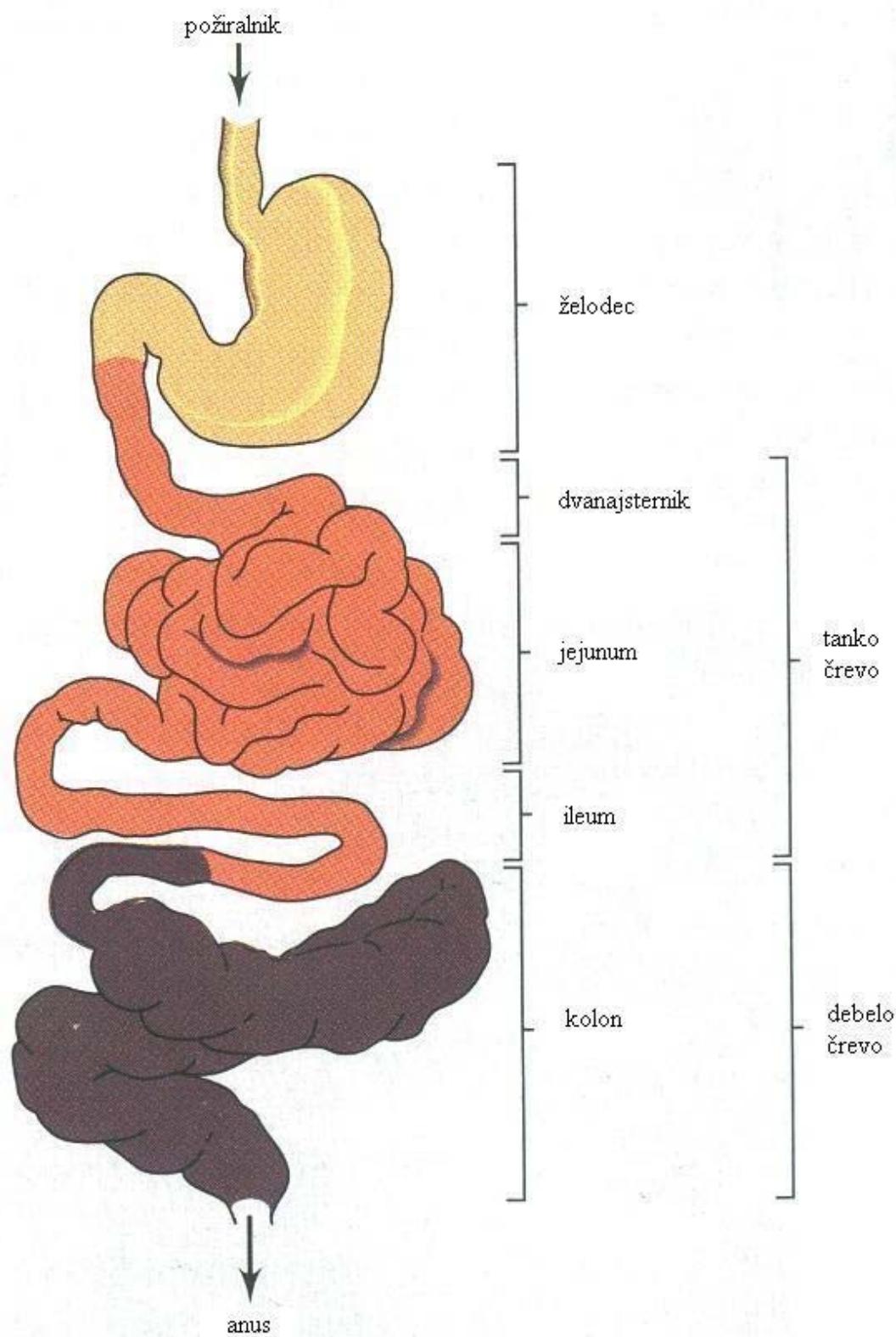
V želodcu človeka je pH dokaj nizek (pH 2), zato lahko predstavlja oviro pred vstopom tujih bakterij v prebavni trakt. Čeprav je število bakterij v vsebini želodca ponavadi nizko, je stena želodca običajno gosto poseljena z bakterijami, kot so acidotolerantni laktobacili in streptokoki. Te bakterije se pojavijo kmalu po rojstvu, celotna združba bakterij pa se vzpostavi tekom prvega tedna življenja. V želodcu poteka razgradnja makromolekul.

Tanko črevo se deli na dva dela dvanajsternik in ileum. Dvanajsternik je bližje želodcu, ima bolj kisel pH in je po mikrobioti bolj podoben želodcu, čeprav lahko manjkajo populacije bakterij na epitelu. Od dvanajsternika proti ileumu postaja pH postopno bolj bazičen, število bakterij pa se povečuje. V večjem delu tankega črevesa so poleg laktobacilov prisotni enterokoki. V spodnjem ileumu najdemo bakterije v lumnu, zmešane s prebavljenim materialom. Tu se razgradnja snovi nadaljuje, hkrati pa tu poteka absorbcija monosaharidov, aminokislin, maščobnih kislin in vode.

V debelem črevesu so bakterije prisotne v velikem številu. Veliko jih živi v samem lumnu in uporablja kot nutiente produkte prebavljenе hrane. Fakultativni aerobi so prisotni v manjšem številu v primerjavi z številom drugih bakterij. Njihove aktivnosti porabijo ves kisik, kar ima za posledico striktno anaerobne pogoje, ki so ugodni za rast obligatnih anaerobov. Številni od teh anaerobov so po Gramu negativne paličice. Značilna sta rodova *Clostridium* in *Bacteroides* ter vrsta *Enterococcus faecalis*. Tu poteka absorbcija žolčnih kislin in vitamina B<sub>12</sub>, pH pa je 7.

Normalna mikrobiota prebavnega trakta se med vrstami razlikuje, pri ljudeh pa je kvalitativno odvisna tudi od prehrane. Ima velik vpliv na sam organizem, saj je vpletena v številne metabolne reakcije, kot so sinteza vitaminov, produkcija plinov in organskih kislin, glikozidazne reakcije ter metabolizem steroidov.

Organizme, ki živijo v lumnu prebavil tok materiala ves čas odnaša. Če se bakterije skušajo vzdrževati v določenem številu, se morajo te izgube nadomestiti z novo rastjo (Brock, 1994).



**Slika 3.** Razdelitev prebavil pri človeku.

### 2.3.3 Pomen bakterij v prebavilih

Glede na dosedanje podatke o vretenčarjih se najbolj številna in kompleksna združba mikrobov nahaja v prebavilih. Mikroorganizmi prispevajo k normalni rasti in razvoju ter fiziologiji tkiv gostitelja. Vplivajo na številne biološke procese, razvoj imunskega sistema, angiogenezo, obnovitev epitela ter morfologijo enterocit (Rawls in sod., 2004). Vplivajo tudi na prehrano organizma (MacFarlane in sod., 1986). Pri ribah so odkrili tudi več genov, katerih delovanje regulira mikrobiota, ki s tem vpliva na pojav različnih fenotipov (Rawls in sod., 2004).

Poročajo, da ob odsotnosti mikrobiote osebki ne morejo privzemati proteinskih makromolekul in tako pride do metabolnega stanja, ki ima značilnosti povezane s stradanjem (Rawls in sod., 2004; Bates in sod., 2006). Ustavljen je tudi diferenciacija epitela prebavil, prav tako so spremenjene specifične funkcije prebavnega trakta, saj pride zaradi odsotnosti mikrobiote do zmanjšane aktivnosti nekaterih encimov (Bates in sod., 2006).

Pri ribah brez mikrobiote v prebavilih je prišlo do zmanjšane sposobnosti razstruljanja prehranskih komponent in drugih snovi iz okolja. Za larve brez mikrobiote so lahko toksični tudi ksenobiotiki (Rawls in sod., 2004).

Nekateri predstavniki mikrobiote lahko kontrolirajo rast patogenih mikroorganizmov in posledično njihov vpliv (Rawls in sod., 2004). Mikrobiota v prebavilih rib vpliva na njihovo občutljivost za bolezni (MacFarlane in sod., 1986; Huber in sod., 2004), saj je veliko vrst bakterij priložnostnih patogenov, ki povzročijo bolezen le, kadar je riba v stresu (MacFarlane in sod., 1986).

Mikrobne skupnosti, povezane z organizmi, se vzpostavijo v določenem času razvoja, ponavadi preden gostitelj odraste (Bates in sod., 2006). Prebavila sesalcev in teleostov se na začetku razvijajo v sterilnih okoljih, svoje dozorevanje pa zaključijo ob prisotnosti mikrobov. Ribe pridobijo svojo mikrobioto iz okolja po izvalitvi (Bates in sod., 2006).

Bakterije, ki kolonizirajo prebavni trakt, torej izvirajo iz okolja, a so selekcionirane po njihovi sposobnosti preživetja znotraj te niše (Huber in sod., 2004; Bates in sod., 2006). Fermentativne bakterije, kot so predstavniki družin Enterobacteriaceae, Vibrionaceae in

Aeromonodaceae, ki rastejo v ribjem prebavnem traktu, so se prilagodile na pogoje, kot so nizek pH, pomanjkanje kisika in obilno količino hrani (Huber in sod., 2004).

Na mikrobioto v prebavilih rib poleg razmer v prebavilih vplivajo tudi sezonske spremembe, predvsem spremembe temperature (Huber in sod., 2004). Tako se sezonsko spremenjata vrstna sestava in številčnost bakterij (MacFarlane in sod., 1986). Povečano število predstavnikov vrste *Aeromonas hydrophila* v prebavilih rib je lahko pokazatelj povečane koncentracije organskih snovi v reki (MacFarlane in sod., 1986).

Za številne kompleksne ekosisteme velja, da se lahko le del celotnega števila bakterij prisotnih v vzorcu izolira in goji na tradicionalnih gojiščih, gojitveno-pogojena identifikacija pa je lahko pristranska zaradi selektivnosti medija in danih pogojev gojenja (Huber in sod., 2004; Rawls in sod., 2004). Večji del mikrobiote, ki jo lahko izoliramo, gojimo in identificiramo, pa ima kljub temu verjetno pomembno vlogo tudi v *in vivo* pogojih (Huber in sod., 2004).

### 2.3.4 Mikrobiota v prebavilih žab

Pri raziskavi Glossinga in sodelavcev (1982a) so iz prebavil žabe večinoma izolirali anaerobne bakterije. Od vseh bakterij v prebavilih je bil delež fakultativnih aerobov le okoli 2% (Hird in sod., 1983). Od teh so prevladovali po Gramu negativni bacili iz družine Enterobacteriaceae (Gossling in sod., 1982a; Hird in sod., 1983) z vrstami *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella arizona* in *Serratia odorifera* (Hird in sod., 1983). Dokaj pogosto so izolirali tudi vrsto *Aeromonas hydrophila* (Hird in sod., 1983) in bakterije iz rodu *Pseudomonas* (Gossling in sod., 1982a).

Glede na mikrobioto v prebavilih so žabe kot občasno vodne živali bolj podobne ribam kot pa endotermnim organizmom. Od slednjih se žabe razlikujejo po nizki telesni temperaturi, počasnejšem metabolizemu, ločitvi odrasle generacije z larvalno periodo z drugačnim načinom življenja in hibernacijo v vodnih okoljih (Gossling in sod., 1982a).

Na mikrobioto lahko vplivajo sezonsko nizke temperature, saj le-te omejujejo možnost prenosa bakterij. Pri žabah so odkrili, da se lahko tipična mikrobiota v prebavilih vzdržuje pri temperaturah blizu zmrzišča in v odsotnost kakršnekoli hrane iz zunanjosti gostitelja, čeprav

le-ta počasi izginja iz črevesja, edina hrana pa so izločki in mukozni okruški. Tipična mikrobiota v prebavilih se ohranja z reproducijo prvotne mikrobiote tudi med hibernacijo in stradanjem (Gossling in sod., 1982 a; Gossling in sod., 1982 b). Fakultativno aerobne bakterije ali pa tiste, ki so se na anaerobne razmere prilagodile, se lažje prilagajajo hladnejšim razmeram kot prvotno anaerobne. Ob hladnejših razmerah lahko povečana rast fakultativnih aerobov v prebavilih povzroča bolezni (Glossing in sod., 1982 b).

### **2.3.5 Mikrobiota v prebavilih rib**

Bakterije izolirane iz prebavil rib, ki so jih gojili pri aerobnih pogojih, so bile večinoma po Gramu negativne z paličasto obliko (Macfarlane in sod., 1986; Huber in sod., 2004; Al-Harabi in Uddin 2005). Največ je bilo predstavnikov proteobakterij podrazreda gama, identificirali pa so tudi predstavnike proteobakterij podrazreda beta, flavobakterij in nekaterih po Gramu pozitivnih bakterij (Huber in sod., 2004).

**Preglednica 1.** Najpogosteji rodovi po Gramu negativnih bakterij, ki so jih do sedaj izolirali iz prebavil rib.

Rod	Reference
<i>Acinetobacter</i>	Huber in sod., 2004; Holben in sod., 2002, MacFarlane in sod., 1986
<i>Aeromonas</i>	Huber in sod., 2004; Al-Harabi in Uddin, 2005, MacFarlane in sod., 1986; Rawls in sod., 2004; Bates in sod., 2006
<i>Alcaligenes</i>	MacFarlane in sod., 1986
<i>Arthrobacter</i>	Huber in sod., 2004
<i>Bacillus</i>	Al-Harabi in Uddin, 2005, MacFarlane in sod., 1986
<i>Corynebacterium</i>	Al-Harabi in Uddin, 2005, MacFarlane in sod., 1986
<i>Enterobacter</i>	MacFarlane in sod., 1986
<i>Escherichia</i>	Al-Harabi in Uddin, 2005
<i>Flavobacterium</i>	Huber in sod., 2004; Al-Harabi in Uddin, 2005; MacFarlane in sod., 1986; Rawls in sod., 2004
<i>Micrococcus</i>	Al-Harabi in Uddin, 2005; MacFarlane in sod., 1986
<i>Mycoplasma</i>	Holben in sod., 2002
<i>Plesiomonas</i>	Huber in sod., 2004
<i>Proteus</i>	Huber in sod., 2004
<i>Pseudomonas</i>	Huber in sod., 2004; MacFarlane in sod., 1986; Rawls in sod., 2004; Bates in sod., 2006
<i>Rhodococcus</i>	Huber in sod., 2004
<i>Serratia</i>	Al-Harabi in Uddin, 2005
<i>Shewanella</i>	Huber in sod., 2004; Al-Harabi in Uddin, 2005
<i>Staphylococcus</i>	Al-Harabi in Uddin, 2005
<i>Vibrio</i>	Al-Harabi in Uddin, 2005; MacFarlane in sod., 1986

Največkrat v literaturi opisani rodovi bakterij izoliranih iz prebavil rib so *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Vibrio* in drugi (preglednica 1).

V svojih raziskavah sta Al-Harbi in Uddin (2005) kot prevladujočo v prebavilih hibridne tilapije določila vrsto *Shewanella putrefaciens*. Večina bakterij, izoliranih iz prebavil šarenke, so bile protobakterije podrazreda gama (Huber in sod., 2004). V raziskavah mikrobiote iz predela med želodcem in dvajsternikom pri lososih so ugotovili, da prevladujejo bakterijske

populacije vrste *Acinetobacter junii* in filotipa *Mycoplasma* (Holben in sod., 2002). Dve tretjine organizmov izoliranih iz prebavil zobčastega ostriža so predstavljali fakultativni ribji patogeni iz rodov *Aeromonas*, *Pseudomonas* in *Vibrio* (MacFarlane in sod., 1986). Po Gramu pozitivna rodova najdena v prebavilih šarenke pa sta bila *Staphylococcus* in *Cutrobacterium* (Huber in sod., 2004).

Nivo bakterijske fermentacije je pri ribah precej nižji kot pri endotermnih organizmih. To je verjetno odsev kombinacije z ogljikovimi hidrati revne prehrane, nizke okoljske in telesne temperature ter relativno majhnega števila bakterij v prebavnem traktu. Posledica tega je strukturno in funkcionalno drugačna mikrobiota v prebavilih, ki ima ponavadi manjšo diverziteto kot tista pri sesalcih in ptičih (Holben in sod., 2002).

## 2.4 FENOTIPSKE LASTNOSTI BAKTERIJ

### 2.4.1 Hemolitična aktivnost

Hemoliza je pojav, pri katerem pride do lize oz. razpada eritrocitov in sprostitev hemoglobina. Pri številnih po Gramu pozitivnih kokih poznamo različne vzorce hemolize. Alfa hemoliza se kaže kot zelenkast obroč okrog kolonije, ki nastane zaradi oksidacije hemoglobina v methemoglobin v eritrocitih. Pri beta hemolizi nastane zaradi popolne hemolize eritrocitov okoli kolonije prozoren obroč. Pri gama hemolizi pa hemolize ni, saj ne opazimo sprememb na trdnem gojišču z dodano krvjo (<http://en.wikipedia.org/wiki/Hemolysis>).

### 2.4.2 Razgradnja celuloze in hitina

Celuloza je eden najpomembnejših naravnih polisaharidov, ki je sestavljen iz glukoznih podenot. Tvori dolge fibrile in se slabo topi, zato jo organizmi počasneje prebavljajo. Med bakterijami je razgradnja celuloze omejena na le nekaj skupin (Brock in sod., 1994). V prebavilih termitov igrajo pri razgradnji celuloze pomembno vlogo simbiotski mikroorganizmi (Adams in Boopathy, 2005).

Hitin je za celulozo drugi najpogosteji polimer v naravi. Sestavljen je iz N-acetylglukozamina, monosaharidnega derivata glukoze, ki ima pomembno vlogo kot vir ogljika in energije za številne organizme. Hitin je prisoten tako v celičnih stenah gliv kot tudi v kutikalah in eksoskeletih nekaterih živali črvastih oblik, mehkužcev ter členonožcev,

predstavlja pa tudi naravne vire N-acetylglukozamina za številne ekosisteme, kot so veliki vodni rezervoarji (Yang in sod, 2006). Razgradnjo hitina katalizirajo encimi, ki se imenujejo hitinaze. Izločajo jih bakterije in glive, producirajo pa jih tudi nekatere rastline (<http://en.wikipedia.org/wiki/Chitin>).

#### 2.4.3 Rast pri različnih temperaturah

Temperatura pri kateri gojimo bakterije vpliva na njihovo rast in delovanje, saj so nekateri procesi v bakterijskih celicah odvisni od temperature

Poznamo:

- *Psihrofilne organizme*

Za psihrofilne organizme je značilna optimalna temperatura rasti pri 15°C ali nižje in maksimalna temperatura rasti pri 20°C ali nižje.

- *Mezofilne organizme*

Mezofilni organizmi so organizmi, ki najbolje rastejo pri temperaturah med 20 in 45°C.

- *Termofilne organizme*

Termofilni organizmi so organizmi, katerih optimalna temperatura rasti je med 45 in 80°C.

- *Hipertermofilne organizme*

Hipertermofilen organizem je mikroorganizem, ki ima temperaturni optimum rasti pri 80°C ali več (Brock in sod., 1994).

Psihrotoleranten organizem je sposoben rasti pri nizki temperaturi, a je njegov temperaturni optimum nad 20°C (Brock in sod., 1994). Psihrotrofne bakterije pa so sposobne preživeti ali celo uspešno rasti v hladnih okoljih ([http://en.wikipedia.org/wiki/Psychrotrophic\\_bacteria](http://en.wikipedia.org/wiki/Psychrotrophic_bacteria)).

### 2.5 DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN IN MEHANIZMI ODPORNOSTI PROTI NJIM

Antibiotiki so proizvodi živih celic, ponavadi gliv ali bakterij, ki ovirajo razmnoževanje in rast mikroorganizmov. Danes se večinoma uporabljajo kemoterapeutiki, ki so izdelani s sintezo ali kemijsko modifikacijo naravnih antibiotikov, pri čemer se izboljšajo njihove protimikrobne in farmakološke lastnosti. Naravne antibiotike in kemoterapeutike s skupnim imenom imenujemo protimikrobne učinkovine.

Po učinkih na bakterije ločimo bakteriocidne protimikrobne učinkovine, ki mikroorganizem poškodujejo in tako preprečijo njegovo razmnoževanje, ter bakteriostatične protimikrobne učinkovine, ki pa razmnoževanje mikroorganizma le zavrejo.

### 2.5.1 Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin

Tarče delovanja protimikrobnih učinkovin so encimi ali pa metabolni procesi, ki so ključni za normalno delovanje bakterijske celice. Glede na delovanje ločimo več skupin protimikrobnih učinkovin.

#### 2.5.1.1 Zaviralci sinteze celične stene

- *Betalaktamski antibiotiki*

Betalaktamski antibiotiki imajo betalaktamski obroč, na katerega se pri penicilinih veže petčlenski, pri cefalosporinih pa šestčlenski obroč. Oba vsebujeta žveplo. Betalaktamski antibiotiki delujejo bakteriocidno. V bakterijsko celico vstopijo skozi celično steno in se vežejo na penicilin vezajoče proteine (PBP), kot sta encima karboksipeptidaza in transpeptidaza. Ti encimi sodelujejo pri tvorbi peptidoglikanske verige, osnovne sestavine bakterijske celične stene, antibiotiki pa jih s svojim delovanjem inaktivirajo. Hkrati pa aktivirajo membranske avtolitične encime, ki uničijo bakterijsko steno. Delujejo predvsem na po Gramu pozitivne bakterije, a jih lahko naredimo primerne tudi za ubijanje po Gramu negativnih bakterij.

Med betalaktamske antibiotike spadajo različne skupine protimikrobnih sredstev. Najbolj razširjeni so penicilini, od katerih poznamo več polsintetičnih in sintetičnih izpeljank s širokim spektrom delovanja. V to skupino spadajo standardni, antistafilokokni in širokospektralni penicilini. Med slednje uvrščamo ampicilin, karboksipenicilin in mezlocilin. Glaven predstavnik celotne skupine pa je penicilin (G in V). Druga skupina so cefalosporini, polsintetične protimikrobne učinkovine, katerih zgradba in delovanje je podobno penicilinom. Sem spadata cefotaksim in cefuroksim. Najširši spekter delovanja med znanimi zaviralci sinteze celične stene imajo karbapenemi, kamor spadata imipenem in meropenem. Monobaktami delujejo na po Gramu negativne bakterije in na vse bakterije, na katere delujejo aminoglikozidi, predstavnik te skupine pa je aztreonam. Poznamo še zaviralce beta-laktamaz (npr. klavulanska kislina, sulbaktam), ki se vežejo z mnogimi beta-laktamazami in tako preprečijo njihovo razdirjalno aktivnost. V kombinacijami z aminopenicilini so učinkoviti

proti mnogim sevom vrste *Haemophilus influenzae* in stafilokokom, sami pa proti bakterijam ne delujejo.

Iz skupine zaviralcev sinteze celične stene poznamo še glikopeptidi in bacitracin (Gubina in Ihan, 2002).

#### 2.5.1.2 Zavralci proteinske sineteze

- *Aminoglikozidi*

Aminoglikozidi preprečujejo začetno proteinsko sintezo s preprečenjem vezave tRNA na ribosomsko podenoto 70S. Na začetku se vežejo na 30S podenoto in preprečijo povezavo med mRNA, formilmetioninom in tRNA. Poznamo streptomycin, kanamicin in gentamicin, ki ga uporabljamo pri okužbah, ki jih povzročajo po Gramu negativne bakterije. Od po Gramu pozitivnih bakterij delujejo le na stafilokoke.

- *Tetraciklini*

Delovanje tetraciklinov je bakteriostatično, ker se vežejo na ribosomsko podenoto 30S. Preprečijo vezavo aminoacil-tRNA na akceptorsko mesto in tako onemogočijo beljakovinsko sintezo. Za zdravljenje bakterijskih okužb jih uporabljamo omejeno zaradi nastanka obširne odpornosti pri neustrezni uporabi v preteklosti. Poznan je tetraciklin.

- *Kloramfenikol*

Kloramfenikol danes pripravljajo sintetično, prvotno pa je bil izoliran iz bakterije. Deluje bakteriostatično. Veže se na 50S ribosomsko podenoto in zavre delovanje peptidiltransferaze ter s tem sintezo peptidnih vezi. Uspešno delujejo proti po Gramu negativnim mikroorganizmom.

- *Makrolidi*

Makrolidi so v manjših koncentracijah bakteriostatični, v večjih pa bakteriocidni. Eden izmed predstavnikov je eritromycin, ki preprečuje translacijo z vezavo na ribosomalni podenoto 50S. Deluje na po Gramu pozitivne koke. Novejša protimikrobnna učinkovina, ki spada med makrolide, je azitromycin.

Znotraj skupine zaviralcev proteinske sinteze poznamo še piranozidne antibiotike – linkozamide in fucidinsko kislino (Gubina in Ihn, 2002).

#### 2.5.1.3 Zaviralci sinteze nukleinskih kislin

- *Trimetoprim*

Delovanje trimetoprima je bakteriostatično. Preprečuje sintezo tetrahidrofolne kisline z zaviranjem encima dehidrofolatreduktaze, deluje pa le na po Gramu negativne mikroorganizme (Gubina in Ihn, 2002).

- *Kinoloni*

Kinoloni so ena najpomembnejših skupin, ki jih pridobivamo sintetično. Osnovna spojina je nalidiksična kislina. Njihovo delovanje je bakteriocidno. Tarča kinolonov so encimi topoizomeraze, ki uravnavajo zvijanje kovalentno zaprte verige DNA. Ti encimi so prisotni pri vseh bakterijah, zato za kinolone pravimo, da imajo širok spekter delovanja (Madigan in sod., 2003). Najbolj raziskana topoizomeraza je DNA-giraza pri *E.coli* (Murray in sod., 1999), dobro pa je poznana tudi topoizomeraza IV.

Kinoloni se vežejo na topoizomeraze, ko so te povezane z DNA in je veriga že prekinjena. Vezava kinolona onemogoči zlepjanje prekinjene verige DNA in tvorbo negativnih navojev. Veriga DNA ne more potovati skozi replikacijske vilice, kar pa onemogoči nadaljnjo replikacijo. Podvojitev DNA preprečijo tudi kompleksi, ki so prosto razpršeni po kromosому in niso povezani z replikacijskimi vilicami (Drlica, 1999).

Kinolone delimo glede na njihov antibakterijski spekter v štiri generacije. Nekateri predstavniki posameznih generacij so: cinoksacin, flumekin in nalidiksična kislina – prva generacija; ciprofloksacin, enoksacin in fleroksacin – druga generacija; balofloksacin, levofloksacin in moksifloksacin – tretja generacija; clinafloksacin, gemifloksacin in sitafloksacin – četrta generacija (<http://en.wikipedia.org/wiki/Quinolones>).

V skupino zaviralcev sinteze nukleinskih kislin spadajo še sulfonamidi.

#### 2.5.1.4 Zaviralci delovanja celične membrane

Delujejo tako, da selektivno zavirajo procese v plazemski membrani prokariontov in tako vplivajo na njihovo razmnoževanje. Poznani so polimiksini.

### 2.5.2 Mehanizmi bakterijske odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam

Vse večja uporaba protimikrobnih učinkovin je vplivala na postopen razvoj bakterijskih sevov, ki so odporni proti eni ali večim protimikrobnim učinkovinam. Poznamo naravno odpornost bakterijskih vrst, kadar bakterije nimajo tarčnih mest, na katera protimikrobnne učinkovine delujejo, ali pa prodor do takšnega mesta preprečuje sestava celične stene. Ena izmed takih naravnih odpornosti je odpornost enterobakterij proti makrolidom in glikopeptidom.

Pridobljeno odpornost lahko posamezni sevi pridobijo z mutacijo ali z prenosom determinant odpornosti. Determinante odpornosti so lahko na kromosomih, ki se prenašajo večinoma le vertikalno (iz generacije v generacijo). Kadar pa je gen, ki povzroča odpornost, na mobilnem genetskem elementu, kot so plazmidi, transpozoni, bakteriofagi in integroni, se ta lahko prenaša horizontalno. Prenos lahko pri bakterijah poteka znotraj vrste, med različnimi vrstami, rodovi, ali pa celo med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami znotraj iste združbe (Madigan in sod., 2003).

Poznamo šest osnovnih mehanizmov odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam:

- sprememba tarčnega mesta delovanja protimikrobne učinkovine z mutacijo;
- prisotnost gena, čigar produkt je sposoben kemijske modifikacije ali hidrolize protimikrobnne učinkovine;
- neprepustnost oz. zmanjšana prepustnost celične membrane za protimikrobeno učinkovino;
- sprememba presnovne poti na katero deluje protimikrobnna učinkovina z mutacijo;
- aktivno izčrpavanje protimikrobnne učinkovine iz bakterijske celice z membranskimi črpalkami;
- odsotnost strukture na katero protimikrobnna učinkovina deluje.

Povečana uporaba protimikrobnih učinkovin pri ljudeh in živalih je povzročala selekcijski pritisk na gene, ki kodirajo odpornost tako v talnih kot v vodnih mikroorganizmih (Chaudhury in sod., 1996; Wood in sod., 1986). Širjenje genov za odpornost s horizontalnim genskim prenosom je vodilo v hitro pojavljanje sevov bakteriji, ki so odporne proti številnim protimikrobnim učinkovinam (Yu-Chang Chang, 2007; Chaudhury in sod., 1996).

### 2.5.2.1 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom

#### 2.5.2.1.1 *Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom zaradi delovanja encimov beta-laktamaz*

Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom je najpogosteje posledica delovanja encimov, beta-laktamaz, ki vplivajo na njihovo sestavo z razgradnjo betalaktamskega obroča. Kodirajo jih plazmidni in kromosomski geni, razlikujejo pa se po substratih na katere delujejo in fizikalno kemijskih lastnostih.

Po Gramu pozitivne bakterije sproščajo beta-laktameze v okolje in tako uničijo protimikrobeno učinkovino zunaj celice. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah, zlasti pri stafilokokih delujejo praviloma le proti penicilinu, zapis zanje pa je na plazmidih, ki se uspešno prenašajo med različnimi sevi tega rodu. Te laktameze so praviloma občutljive proti zavircem beta-laktamaz, kot je klavulanska kislina.

Po Gramu negativne bakterije z beta-laktamazami uničijo protimikrobeno učinkovino ob vstopu le-te v celico. Te bakterije imajo lahko inducibilno beta-laktamazo, ki je kodirana na kromosому. Njeno delovanje je učinkovitejše proti cefalosporinom kot penicilinom. Ob prisotnosti protimikrobine učinkovine, se sinteza tega encima poveča in bakterija posledično postane odporna (značilno za *Enterobacter cloacae*, *Serratia* sp).

Tudi pri po Gramu negativnih bakterijah najdemo plazmidne gene za beta-laktamaze. Najpogostejše so iz skupin TEM in SHV, ki hidrolizirajo peniciline in ozkospektralne cefalosporine, ne pa cefalosporine tretje generacije, kot sta cefotaksim in ceftazidim, niti karbapeneme (imipenem) in monobaktame (aztreonam).

Poznamo beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ESBL), ki so posledice mutacije genov prej omenjenih beta-laktamaz. Geni za ESBL se ponavadi nahajajo na plazmidih.

#### *2.5.2.1.2 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom povezana s PBP encimi*

Pomemben mehanizem odpornosti proti betalaktamom je sprememba PBP encimov v bakterijski steni, ki so nujni za sintezo peptidoglikana, osnovne sestavine celične stene.

Obstajata dve različici odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom preko PBP. Odpornost je lahko vzrok alternativne poti sinteze peptidoglikana, z geni, ki kodirajo nastanek novih PBP, ki jih betalaktamski antibiotiki ne zavirajo. Odpornost pa se lahko pojavi tudi zaradi spremembe že obstoječih PBP, kar zmanjšuje afiniteto do vezave penicilina.

Občutljivosti se lahko bakterijske celice izognejo s tvorbo dodatnih PBP (Livermore, 1998; Murray in sod., 1999). Slednji način in spremenjanje normalnih PBP sta najpomembnejša mehanizma odpornosti pri po Gramu pozitivnih bakterijah, medtem ko imajo pri po Gramu negativnih bakterijah najpomembnejšo vlogo beta-laktamaze (Shlaes in Rice, 1999).

#### *2.5.2.1.3 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom zaradi spremembe porinov*

Zaradi specifične sestave celične stene pri po Gramu negativnih bakterijah se pojavlja še ena vrsta odpornosti proti betalaktamom, pri kateri pride z mutacijami do sprememb porinov, beljakovin, ki sestavlajo kanale v celični steni skozi katere pridejo betalaktamski antibiotiki do PBP. Te mutacije preprečujejo dostop protimikrobnih učinkovin do njihovih vezavnih mest.

#### *2.5.2.1.4 Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom zaradi aktivnega izčrpavanja protimikrobne učinkovine*

Odpornost proti betalaktamskim antibiotikom se lahko pojavi tudi zaradi aktivnega izčrpavanja iz mesta delovanja (Livermore, 1998; Murray in sod., 1999).

### *2.5.2.2 Odpornost proti aminoglikozidom*

Odpornost proti aminoglikozidom je najpogosteje posledica delovanja encimov, in sicer acetiltransferaze, adeniltransferaze in fosfotransferaze, ki naredijo aminoglikozide neučinkovite. Zapisi za te encime so na plazmidih in transpozonih, ki se lahko prenašajo med različnimi rodovi bakterij. Pogosto so del genetskih elementov imenovanih integroni.

#### 2.5.2.3 Odpornost proti makrolidom

Odpornost proti makrolidom je najpogosteje posledica spremembe vezavnih mest za te protimikrobne učinkovine. Najpogosteje so za to odgovorni *erm* geni za encime, ki metilirajo ostanke v 23S podenoti rRNA in tako povzročijo konformacijsko spremembo ribosoma, ki zmanjša afiniteto do makrolidov. Vzroki za odpornost so lahko tudi inaktivacija makrolidov z encimi in črpanje makrolidov iz celic.

#### 2.5.2.4 Odpornost proti tetraciklinom

Odpornost proti tetraciklinom je posledica aktivnega izčrpavanja protimikrobne učinkovine iz celice z membranskimi proteini, ki jih kodirajo na novo pridobljeni geni.

Do drugega načina odpornosti, ki se pojavi le pri po Gramu negativnih bakterijah, lahko pride zaradi spremenjene prepustnosti celične stene za to protimikrobno učinkovino, ki je posledica kromosomskih mutacij.

#### 2.5.2.5 Odpornost proti trimetoprimu

Odpornost proti trimetoprimu je lahko posledica kromosomskih mutacij, pri čemer pride do zmanjšanje prepustnosti celične stene za to protimikrobno učinkovino ali pa se spremeni encim dihidrofolatreduktraze, na katerega le-ta deluje. Odpornost se lahko pojavi zaradi prenosa plazmidnih genov, ki kodirajo dihidrofolatreduktazo, ki je odporna proti trimetoprimu.

#### 2.5.2.6 Odpornost proti kinolonom

Poznamo dva tipa odpornosti proti kinolonom, ki sta posledica mutacij kromosomskih genov. Prvi tip je sprememba tarčnih encimov zaradi mutacij. Drugi tip pa je zmanjšana koncentracija kinolona v bakterijski celici zaradi povečanega izčrpavanja kinolonov z membranskimi črpalkami ali pa zaradi zmanjšane propustnosti membrane. Odpornost proti kinolonom lahko kodirajo tudi plazmidi (Jacoby, 2005).

#### 2.5.2.6.1 *Plazmidno kodirana odpornost proti kinolonom-PMQR (plasmid-mediated quinolone resistance)*

Pojem odpornosti pri PMQR pomeni kakršenkoli dvig minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), gre torej za biološko in ne medicinsko definicijo, kjer je odpornost definirana kot dvig MIC nad določeno mejo (CLSI-standard) (Robicsek in sod., 2006a).

Prvi mehanizem odpornosti PMQR je z zaščito tarčnega mesta. Poznamo štiri determinante, in sicer *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* in *qnrS*. Plazmidi, ki nosijo *qnr* gene so zelo raznolikih velikosti in imajo prisotne tudi druge gene za različne, večinoma številne odpornosti. Te determinante so nas še posebej zanimale, saj so v preteklih raziskavah odkrili, da so se verjetno mobilizirale pri predstavnikih rodu *Shewanella* in drugih psihrofilnih vrstah (Poirel in sod., 2005). Okoljski sevi so tako lahko viri za nove determinante odpornosti, ki se nato širijo tudi v kliničnih sevih.

Drugi mehanizem odpornosti je kemijska modifikacija kinolonov, ki jo omogoči nova različica gena za aminoglikozidno acetiltransferazo (*aac(6')-Ib*), *aac(6')-Ib-cr*. Tretji mehanizem odpornosti je izločanje protimikrobne učinkovine z membransko črpalko (Picao in sod., 2008).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Človeška ribica (*Proteus anguinus*)

Osebek smo izlovili 27. 10. 2008 v Planinski jami. Bil je spolno nezrel samec. Tehtal je 16,865 g, dolžina njegovega telesa pa je bila 24,8 cm.

##### 3.1.2 Bakterijski sevi

V okviru diplomske naloge smo preučevali nekatere fenotipske lastnosti in plazmide bakterijskih sevov izoliranih iz prebavil človeške ribice.

Laboratorijski sev *Escherichia coli*, ki smo ga uporabili pri delu (konjugacija), je iz zbirke Katedre za molekularno genetiko Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Gre za sev J53 z genotipom, Az<sup>r</sup> (vir: G. A. Jacoby). Poleg tega smo uporabili še sev DH5, in sicer pri kloniranju za vnos rekombinantrih plazmidov. Ta je prav tako iz iste zbirke, vir pa je DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

##### 3.1.3 Gojišča

###### 3.1.3.1 Priprava tekočih gojišč Luria-Bertani (LB)

Za pripravo tekočih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB (0,5-odstotni kvasni ekstrakt, 1-odstotni tripton, 1-odstotni NaCl). V epruvete smo odpipetirali po 10 ml raztopljenega gojišča in ga sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C.

###### 3.1.3.2 Priprava trdnih gojišč LB

Za pripravo trdnih gojišč LB smo v deionizirani vodi raztopili 25 g/l gojišča LB in 15 g/l agarja ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C. Ko se je gojišče v vodni kopeli ohladilo na približno 55°C, smo ga vlili v sterilne plastične petrijevke.

###### 3.1.3.3 Priprava trdnih gojišč 1x, 5x in 10xLB

Za pripravo trdnih gojišč 1xLB, 5xLB in 10xLB smo v deionizirani vodi raztopili določeno količino gojišča LB (glej preglednico 2) in 15 g/l agarja. Gojišča smo nato sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C. Ko se je gojišče v vodni kopeli ohladilo na približno 55°C, smo ga vlili v sterilne plastične petrijevke.

**Preglednica 2.** Različne koncentracije gojišča LB.

gojišče	koncentracija gojišča LB [g/l]
1xLB	0,25
5xLB	1,25
10xLB	2,5

### 3.1.3.4 Priprava trdnih gojišč LB z dodano protimikrobnoučinkovino

Osnovno gojišče smo pripravili tako, kot je opisano v točki 4.1.3.2. Gojišču, ohlajenemu na 55°C, smo sterilno dodali protimikrobnoučinkovino do ustrezne končne koncentracije, ki so podane v preglednici 3. Ta postopek smo uporabili za pripravo gojišča LB z ampicilinom, ampicilinom in natrijevim azidom, nalidiksično kislino ter štirimi različnimi koncentracijami cefotaksima. Po dodatku protimikrobnoučinkovine smo gojišče ponovno premešali s pomočjo magnetnega mešala ter ga nato vlili v sterilne plastične petrijevke.

Cefotaksim smo imeli v prahu, zato smo ga najprej raztopili v deionizirani vodi do želene založne koncentracije (10 mg/ml). Raztopino smo sterilizirali s filtriranjem preko filtra s porami velikosti 0,2 µm.

Za modro-belo selekcijo po kloniranju smo na trdna gojišča LB z ampicilinom pred uporabo nanesli 40 µl X-gal-a (20 mg/ml) v dimetilformamidu.

**Preglednica 3.** Založne in končne koncentracije protimikrobnih učinkovin v gojišču LB.

dodana snov	založna konc. [mg/ml]	končna konc. v gojišču [µg/ml]
cefotaksim	10	1; 2; 4; 6
ampicilin	100	100
natrijev azid	150	175
nalidiksična kislina	100	25

### 3.1.3.5 Priprava trdnih gojišč BHI (Brain Heart Infusion)

Za pripravo trdnih gojišč BHI smo v deionizirani vodi raztopili 37 g/l gojišča BHI (12,5 g/l ekstrakta možganov, 5 g/l ekstrakta govejega srca, 10 g/l peptokompleksa, 2 g/l glukoze, 5 g/l

NaCl, 2,5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in 15 g/l agarja ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55°C, smo ga nalili v sterilne plastične petrijevke.

### 3.1.3.6 Priprava trdnih gojišč Muller-Hinton (MH)

Za pripravo trdnih gojišč MH smo v deionizirani vodi raztopili 21 g/l gojišča MH (2 g/l govejega ekstrakta, 17,5 g/l kazeina, 1,5 g/l škroba) in 15 g/l agarja. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55°C, smo ga nalili v sterilne plastične petrijevke.

### 3.1.3.7 Priprava krvnega agarja (BAB)

Za ugotavljanje hemolitične aktivnosti smo uporabili diferencialno gojišče, krvni agar, s pomočjo katerega smo bakterije med seboj razlikovali glede na vrsto hemolize. Za pripravo krvnega agarja smo v deionizirani vodi raztopili 40,5 g/l gojišča BAB (15 g/l peptoze, 2,5 g/l ekstrakta jeter, 2,5 g/l kvasnega ekstrakta, 5 g/l NaCl, 13 g/l agarja) in sterilizirali z avtoklaviranjem 15 minut pri 121°C. Ko se je gojišče v vodni kopeli ohladilo na približno 55°C, smo mu dodali 5 % govejih eritrocitov (50 ml govejih eritrocitov – goveje krvi na 1 l LB gojišča). Po premešanju smo gojišče nalili v sterilne plastične petrijevke.

### 3.1.3.8 Priprava minimalnih gojišč z hitinom ali karboksimetil celulozo (CMC)

Gre za minimalna gojišča z dodanim hitinom ali karboksimetil celulozo kot edinim virom ogljika in energije (glukoze ni). V 700 ml deionizirane vode smo raztopili 15 g agarja kot osnovnega sredstva za trdna gojišča in 2,4 g hitina ali 5 g karboksimetil celuloze. Hitin smo pred dodatkom v gojišče strli v terilnici s tekočim dušikom in presejali. V drugi erlenmajerici smo pripravili 100 ml minimalnega gojišča 10A in mu dodali 200 ml deionizirane vode. Za 100 ml minimalnega gojišča 10A smo v 100 ml deionizirane vode dodali 1 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,5 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 0,469 g Na-citrat x 2H<sub>2</sub>O. Obe raztopini smo ločeno avtoklavirli in ju nato združili. Ko se je gojišče ohladilo na približno 55°C, smo mu dodali še 100 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in ga vlili v plastične sterilne petrijevke.

### 3.1.3.9 Priprava minimalnih gojišč z agarozo ter hitinom ali karboksimetil celulozo

Da bi preverili, ali so bakterije kot vir ogljika uporabile hitin oz. CMC, ne pa nedefiniranih primesi v agarju, smo namesto agarja pri pripravi gojišč kot sredstvo za trdoto uporabili tudi agarozo ter gojišča pripravili na podoben način.

V 350 ml deionizirane vode smo raztopili 7,5 g agaroze in 1,2 g hitina ali 2,5 g karboksimetil celuloze. V drugi erlenmajerici smo pripravili 50 ml minimalnega gojišča 10A in mu dodali 100 ml deionizirane vode. Za 50 ml minimalnega gojišča smo v 50 ml deionizirane vode dodali 0,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5,25 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 0,235 g Na-citrat x 2H<sub>2</sub>O. Po

avtoklaviranju smo raztopini združili, v na 55°C ohlajeno gojišče dodali še 0,05 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O in ga vlili v plastične sterilne petrijevke.

### 3.1.4 Kemikalije

AB BIODISCS – SOLNA (Švedska)

- Etest

BIOLIFE ITALIANA

- agar (agar technical)
- BHI (brain heart infusion)
- MH (Muller-Hinton)
- BAB (blood agar base)

BIO-RAD

- SDS

FERMENTAS

- PCR Master Mix (0,05 enot/µl Taq DNA polimeraze v reakcijskem pufru: 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM vsakega od dNTPjev (dATP, dCTP, dGTP, dTTP))
- Dream Taq<sup>TM</sup> Green PCR Master mix
- deionizirana voda brez nukleaz
- nanašalni elektroforezni pufer
- DNA velikostni standardi (1 kb DNA Ladders, 1 kb Plus DNA Ladders, 50 bp DNA Ladders)
- X-gal: 5-bromo-4-kloro-3indolil-β-D-galaktozid

KEMIKA

- EDTA
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- saharoza

## MERCK

- izopropanol
- 96-odstotni etanol
- kloroform
- fenol
- izoamilalkohol
- natrijev klorid
- $K_2HPO_4$
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- CTAB
- lizocim

## ROTH

baza Tris

## SEAKEM

- agarozna

## SIGMA

- etidijev bromid (10 mg/ml)
- LB (Luria-Broth medium)
- natrijev azid
- ampicilin
- karboksimetil celuloza (CMC)
- triton x-100
- natrijev hidroksid
- natrijev citrat
- nalidiksična kislina
- hitin
- Lambda DNA – masni standard
- 0,3 % MS222 (m-aminobenzoat metasulfonske kisline ali tricaine methane sulfonate)

## CARLO ERBA

- glicerol

Encimi

## FERMENTAS

- *PstI*
- Fast digest® *PstI*
- Fast digest® *EcoRI*
- Fast digest® *HindIII*
- *SalI*
- *BcI*
- T4 DNA ligaza

### 3.1.5 Pufri in reagenti

#### 3.1.5.1 Barvanje po gramu

Za barvanje po Gramu smo uporabili sledeče raztopine:

- lugolova raztopina (1 % jod, 2 % kalijev jodid v vodi),
- raztopina kristal vijoličnega (2 % kristal vijolično v etanolu),
- raztopina safranina (0,25 % safranin v 20 % etanolu).

#### 3.1.5.2 Izolacija genomske DNA s kompletom Genomic DNA Purification Kit #K0512, Fermentas

Pri izolaciji genomske DNA s kompletom smo uporabili:

- lysis solution: v kompletu, pripravljena za uporabo,
- precipitation solution: v kompletu, 10X koncentrirana, pred uporabo smo jo morali razredčiti,
- NaCl solution: v kompletu, 1,2 M raztopina NaCl,
- pufer TE z RNazo (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNaza).

#### 3.1.5.3 Izolacija plazmidne DNA z alkalno hidrolizo

Pri izolaciji plazmidne DNA z alkalno hidrolizo smo uporabljali naslednje raztopine:

- raztopina I (50 mM glukoza, 25 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA), ki smo jo umerili na vrednost pH 8, avtoklavirali 15 minut pri 121°C in do uporabe hranili pri 4°C ,

- raztopina II (0,2 M NaOH, 1-odstotni SDS), ki smo jo pripravili tik pred uporabo,
- raztopina III (60 ml 5 M kalijevega acetata, 11,5 ml ledocetne kisline, 28,5 ml deionizirane vode), ki smo jo avtoklavirali 15 minut pri 121°C in do uporabe hranili pri 4°C,
- raztopina FKI (fenol-kloroform-izoamilalkohol v razmerju 25:24:1),
- raztopina kloroform-izoamilalkohol v razmerju 24:1,
- 96-odstotni etanol,
- 80-odstotni etanol,
- pufer TE z RNazo (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNaza).

#### 3.1.5.4 Ločevanje nukleinskih kislin z elektroforezo na agaroznem gelu

Za pripravo agaroznih gelov in elektroforezo smo uporabili:

- pufer 5 X TBE (0,45 mM Tris-borat; 10 mM EDTA), ki smo ga hranili pri sobni temperaturi,
- agarozo za pripravo gela,
- etidijev bromid (založna koncentracija 10 mg/ml),
- nanašalni elektroforezni pufer (0,25-odstotni bromfenol modro, 0,25-odstotni ksilencianol, 40-odstotna saharoza).

#### 3.1.5.5 Izolacija plazmidne DNA s CTAB in tritonom X-100

- STET (8 % saharoza, 0,1 % Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8)
- CTAB (5 % centil-trimetil-amonijev bromid)
- lizocim (50 mg/ml v vodi)
- 1,2 M NaCl
- 96-odstotni etanol
- 80-odstotni etanol
- pufer TE z RNazo (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 50 µg/ml RNaza)

#### 3.1.5.6 Restrikcija

- ustrezen pufer, ki je potreben za delovanje določenega encima – po navodilih proizvajalca (Fermentas).

### 3.1.6 Kompleti in testi

- komplet za izolacijo genomske DNA - Genomic DNA Purification Kit #K0512 (Fermentas)
- komplet za čiščenje DNA iz gela - QIAquick Gel Extraction Microcentrifuge and Vacuum Protocol (QIAGEN)
- komplet za čiščenje DNA iz gela - DNA Extraction Kit #K0513 (Fermentas),
- komplet za čiščenje pomnožkov reakcije PCR - QIAquick PCR Purification Protocol using a microcentrifuge (QIAGEN)
- ESBL test - ESBL Confirmatory Test Sensi Disc, Becton Dickinson & Co.; kombinacija Ceftazidime 30 µg (CAZ) in Ceftazidime/Clavulanic acid 30/10 µg (CAZ/CLA); Cefotaxime/Clavulanic acid 30/10 µg (CT/CLA)
- E test: Cefotaxime in Cefotaxime/Clavulanic acid (CT/CTL) – gradient koncentracij [µg/ml]
- E test: moksifloksacin – gradient koncentracij [µg/ml]

### 3.1.7 Protimikrobní diskí

Fenotipske lastnosti sevov določenega rodu smo ugotavljali tudi s standardnimi diskí, prepojenimi s protimikrobnimi učinkovinami, katerih koncentracije so podane v preglednici 4.

Preglednica 4. Uporabljeni diskí prepojeni s protimikrobnimi učinkovinami določene koncentracije.

oznaka	protimikrobná učinkovina	konzentracia [µg]	proizvajalec
TC 30	tetraciklin	30	BD BBL
CIP 5	ciprofloksacin	5	Oxoid
AM 10	ampicilin	10	Difco
E 15	eritromicin	2	BD BBL
S 10	streptomycin	10	BD BBL
IPM 10	imipenem	10	BD BBL
AZM 15	azitromicilin	15	Benex Limited
CXM 30	cefuroksim	30	BD BBL
GM 10	gentamicin	10	BD BBL
C 30	kloramfenikol	30	BD BBL
TMP 5	trimetoprim	5	Difco

### 3.1.8 Pripor in oprema

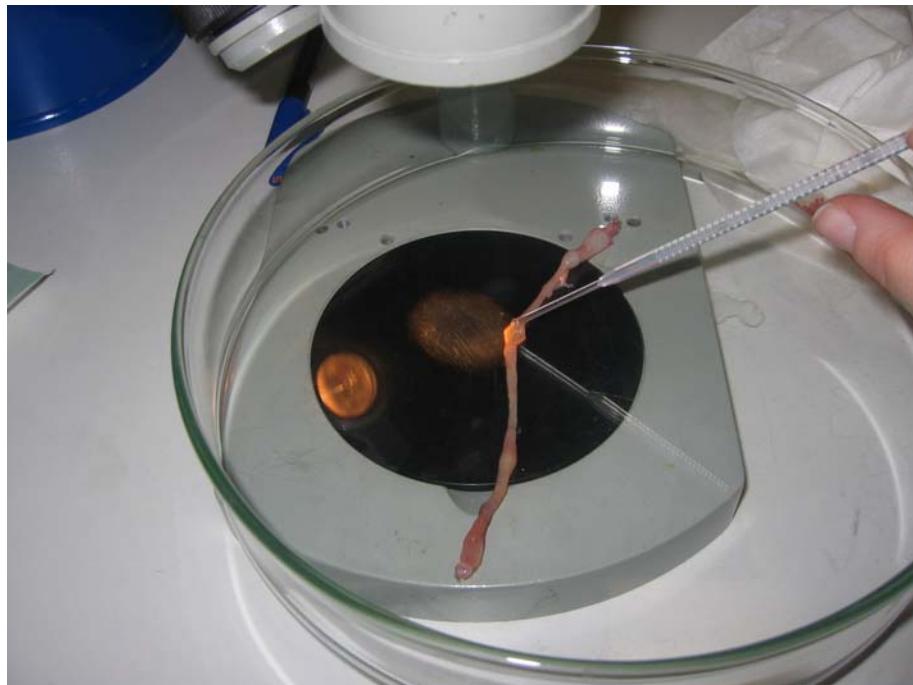
- labolatorijske rokavice
- labolatorijska steklovina: čaše, merilni valji, elrenmajerice, epruvete, petrijevke...
- labolatorijske cepilne zanke
- mikrocentrifugirke (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- PCR mirocentrifugirke (MicroAmp, perkin Elmer)
- objektna in krovna stekelca (Tlos, Zagreb, Hrvatska)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija Biohit, Finska)
- plastične petrijevke
- sterilne vatenke in zobotrebci
- svetlobni mikroskop
- stresalnik (Infors HT)
- ciklični termostat GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- namizno centrifugo (Eppendorf Centrifuge 5417C)
- sistem za elektroforezo DNA 2301 Macrodrive 1 (LKB Bromma)
- namizno centrifugo (Beckman)
- centrifugo (Sorval)
- rotacijski stresalnik (Biofuge 13, Heraeus)
- vibracijski mešalnik (SBD)
- magnetno mešalo (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- avtoklav (Kambič, Slovenija)
- gorilnik (Tlos, Zagreb, Hrvatska)
- digestorij (Variolab Mobilen W90)
- tehnicka Santer SD 1000T (Tehnica, Železniki, Slovenija)
- pH meter (Metrohm, Švica)
- pipeta za večje volumne (Biohit, Finska)
- centrifugirke (Techno Plastic Products, Švica)

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Izolacija bakterijskih sevov iz prebavila človeške ribice (*Proteus anguinus*)

Osebek smo dan po izlovu uspavali z 0,3 % MS 222 (m-aminobenzoat metasulfonske kislina ali tricaine methane sulfonate, Sigma). V raztopini smo ga pustili 25 minut in ga usmrtili z dekapitacijo. Osebek smo stehiali in izmerili. Aseptično smo ga odprli in izolirali prebavila. Ker je močeril zaščiten, prilagam k diplomi kopijo dovoljenja za izlov močerilov, ki ga je izdalo Ministrstvo za okolje, prostor in energijo Republike Slovenije.

Iz notranje površine posameznih delov njegovih prebavil (ust, požiralnika, želodca, dvanajsternika, tankega in debelega črevesa) smo vzeli vzorce z cepilno zanko (10 µl) oz. vatenko in jih razmazali na trdna gojišča LB, minimalna gojišča in plošče krvnega agarja. Na plošče smo razmazali tudi vsebine posameznih delov prebavil. Vzorce smo vzeli še s ciste stene prebavnega trakta. Ciste so vsled endoparazitov prisotne v vezivu mehkih tkiv močerila. Plošče smo nato gojili v komori pri temperaturi 19°C. Po trinajstdnevni inkubaciji smo plošče pregledali in precepili različne kolonije z določenega dela prebavil. Posamezne seve smo nato še večkrat precepili, dokler nismo dobili čistih kultur, katerih lastnosti smo preverjali. Čiste kulture smo po inkubaciji hranili na trdnih gojiščih LB pri 4°C in jih na vsake 3 tedne precepili na nova gojišča LB.



Slika 4. Vzorčenje z različnih predelov prebavil močerila.

Z vsake originalne plošče smo precepili po eno različno kolonijo določenega tipa ne glede na to, v kolikšni meri se je tak tip kolonij pojavljal na plošči, ali je šlo za eno oz. posamezne kolonije (npr. rod *Oerskovia*), ali pa je tak tip kolonij preraščal večino prvotne plošče (npr. rod *Aeromonas*).

### 3.2.2 Preverjanje nekaterih fenotipskih lastnosti

Z ugotavljanjem hemolitične aktivnosti, možnosti uporabe hitina in CMC kot edinega vira ogljika, rasti pri različnih temperaturah in odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam, smo poskušali ugotoviti, kakšna je pestrost med izoliranimi sevi znotraj posameznega rodu – ali se sevi istega rodu med sabo razlikujejo in koliko je teh različnih sevov znotraj posameznih rodov.

Glede na največjo pogostost rodov *Aeromonas* in *Shewanella* smo različne lastnosti preverjali pri vseh izolatih iz teh dveh rodov ter pri večini izolatov iz rodov *Serratia* in *Bacillus* skupine d. Iz preostalih rodov, ki so bili zastopani z enim ali dvema izolatom, smo različne lastnosti preverjali le za en izoliran sev posameznega rodu (*Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* skupine a, *Oerskovia*).

#### 3.2.2.1 Barvanje po Gramu in svetlobna mikroskopija

Barvanje po Gramu smo uporabili za začetno razlikovanje med izolati, preden smo le-te natančneje določili. Gre za diferencialno barvanje pri katerem ločimo po Gramu negativne in po Gramu pozitivne bakterije. Pri po Gramu negativnih bakterijah se netopni kompleksi kristal vijoličnega, ki nastanejo med barvanjem, z etanolom izperejo iz celic. Celice so po barvanju zaradi safranina obarvane rožnato. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah se zaradi drugačnih struktur v celični steni nastali kompleksi ne izperejo in povzročajo značilno modrovijolično barvo.

Na objektno stekelce smo s plastično cepilno zanko nanesli čisto bakterijsko kulturo s trdnih gojišč LB in jo fiksirali nad plamenom plinskega gorilnika. Na bakterijsko kulturo na objektnem stekelcu smo kanili nekaj kapljic barvila kristal vijolično in inkubirali 30 sekund. Nato smo preparat sprali z deionizirano vodo. Dodali smo lugolovo raztopino za 60 sekund in nato fiksirano bakterijsko kulturo spet sprali z deionizirano vodo. Preparat smo razbarvali z 96-odstotnim etanolom in sprali z deionizirano vodo. Dodali smo safranin ter po 30 sekundah

spet sprali z deionizirano vodo. Preparat smo posušili na zraku in ga opazovali pod svetlobnim mikroskopom pri 1000 x povečavi, pri čemer smo uporabili imerzijsko olje.

### 3.2.2.2 Morfološki opis čistih kultur

Izolirane seve smo skušali med seboj ločiti tudi na podlagi morfoloških značilnosti, predvsem barve. Na podlagi morfologije in barvanja po Gramu smo seve razvrstili v okvirne skupine. Nekatere seve posameznih skupin smo natančneje določili, tako da smo izolirali njihovo genomske DNA in pomnožili 16S rDNA s pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Dobljenim fragmentom smo določili zaporedje nukleotidov in izolirane seve na podlagi tega uvrstili v rodove. Glede na morfološko podobnost z identificiranimi rodovi, smo okvirno v rodove uvrstili tudi preostale seve.

Pri nadaljnjem delu smo se bolj osredotočili na po Gramu negativne izolate, ki so bili pogostejši.

### 3.2.2.3 Hemolitična aktivnost

Čiste bakterijske kulture smo precepili na plošče krvnega agarja (BAB). S cepilno zanko smo zajeli bakterijsko kulturo s trdnega gojišča LB in se z njo dotaknili plošče krvnega agarja, pod katero smo podstavili narisano kvadratno mrežo z oznakami posameznih sevov. Zanimivejše seve smo še enkrat precepili na četrtno plošče krvnega agarja in ponovno določili hemolitičnost. Med različnimi vrstami hemolize nismo razlikovali. Tako alfa kot beta hemolizo smo označili za pozitivno hemolitično aktivnost določenega seva.

### 3.2.2.4 Rast na gojiščih z hitinom (H) ali karboksimetil celulozo (CMC)

Preverjali smo tudi sposobnost rasti posameznih sevov na gojiščih, kjer sta bila vir energije in ogljika namesto glukoze hitin ali karboksimetil celuloza. Pripravili smo dve vrsti gojišč. Ena so poleg H in CMC vsebovala tudi agar (kot tudi osnovna gojišča LB), druga pa so namesto agarja vsebovala agarozo, saj lahko agar vsebuje različne nedefinirane primesi, ki jih bakterije lahko uporabijo kot vir ogljika. Na eno ploščo smo nacepili po štiri različne seve, vsakega na eno četrtno plošče

### 3.2.2.5 Rast pri različnih temperaturah

Čiste bakterijske kulture smo precepili na gojišča LB in jih gojili pri različnih temperaturah, in sicer pri 7°C, 15°C, 19°C, 30°C in 37°C. Vsako ploščo smo razdelili na štiri dele in na vsak del nacepili drug sev. Čas inkubacije smo prilagodili hitrosti rasti bakterijskih kultur, pri večini sevov je bil ta čas dva dni.

### 3.2.2.6 Odpornost proti protimikrobnim učinkovinam

Pri izolatih smo preverjali odpornost proti različnim skupinam protimikrobnih učinkovin, in sicer penicilinom (ampicilin), cefalosporinom (cefuroksim, cefotaksim), karbapenemom (imipenem), aminoglikozidom (gentamicin, streptomicin), makrolidom (azitromicin, eritromicin), tetraciklinom (tetraciklin), kinolonom (ciprofloksacin, nalidiksična kislina) in drugim (kloramfrnikol, trimetoprim). Pri skoraj vseh skupinah protimikrobnih učinkovin smo uporabili difuzijsko metodo z diskami. Eno cepilno zanko kulture s trdnega gojišča LB smo suspendirali v 500 µl tekočega gojišča LB v mikrocentrifugirki. S sterilno vatenko smo zajeli del resuspendirane kulture in jo enakomerno razmazali na plošče gojišča MH. Na vsako ploščo smo nanesli dva do tri diske z različnimi protimikrobnimi učinkovinami. Po približno dvodnevni inkubaciji, prilagojeni hitrosti rasti kulture, smo odčitali cone inhibicije okoli posameznega diska. S primerjavo premerov con inhibicije naših sevov s podatki proizvajalca smo določili, ali je sev odporen, intermediaren ali pa občutljiv za posamezeno protimikrobeno učinkovino.

Pri cefotaksimu, ki spada med cefalosporine in nalidiksični kislini, ki spada med kinolone, smo za detekcijo odpornosti uporabili gojišča LB z različnimi koncentracijami cefotaksima (1, 2, 4 in 6 µg/ml), koncentracija nalidiksične kislinskega gojišča LB pa je bila 25 µg/ml. Za posamezen sev smo določili le, če raste ali ne pri posamezni koncentraciji dodane protimikrobne učinkovine.

### 3.2.3 Izolacija genomske DNA

Od 10 mg do 20 mg bakterijske kulture smo s cepilno zanko postrgali s trdnega gojišča LB in jo s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku oz. premešanjem z avtomatsko pipeto suspendirali v 200 µl pufrja TE. Vzorcu smo dodali 400 µl "lysis solution", premešali in inkubirali 5 minut pri 65°C. Takoj po koncu inkubacije smo vzorcu dodali 600 µl kloroform, nežno emulzirali z obračanjem mikrocentrifugirke (3- do 5-krat) in centrifugirali 2 minuti pri 10.000 vrt./min. Zgornjo vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 800 µl sveže pripravljene precipitacijske raztopine (720 µl sterilne deionizirane vode, 80 µl 10x "concentrated solution") in previdno mešali z obračanjem mikrocentrifugirke 1 do 2 minuti pri sobni temperaturi. Po 2 minutnem centrifugiranju pri 10.000 vrt./min smo odstranili supernatant in popolnoma raztopili usedljivo DNA v 100 µl 1,2 M raztopine NaCl z nežnim vorteksiranjem. Dodali smo 300 µl 96-odstotnega hladnega etanola in inkubirali eno uro pri -

20°C. Večinoma smo vzorce v zamrzovalniku pustili dlje časa, tudi preko noči, saj smo ugotovili, da je bil pri teh vzorcih izkoristek izolacije DNA boljši. Po končani inkubaciji smo vzorce centrifugirali 4 minute pri 10.000 vrt./min. Nato smo odlili etanol, usedlino sprali s 500 µl 70-odstotnega hladnega etanola in vzorce še enkrat centrifugirali 30 sekund pri 10.000 vrt./min. Spet smo odlili etanol in vzorce posušili pri 37°C. DNA smo nato raztopili v 30-50µl pufla TE z RNAZo. Vzorce smo do ponovne uporabe shranili v zamrzovalniku pri -20°C. Pri nekaterih sevih smo izolirali genomsko DNA iz bakterijskih kultur gojenih pri 19°C in 37°C.

Uspešnost izolacije genomske DNA smo preverjali tako, da smo 3 µl izolata nanesli skupaj z nanašalnim pufrom v razmerju 5:1 na 0,9 % agarozni gel in DNA ločevali z agarozno gelsko elektroforezo pri napetosti 12 V/cm gela, v pufru 1 X TBE približno 30 minut. Glede na jakost fluorescence ob presvetlitvi gelov z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm in primerjavo flurescence vzorcev s fluresenco standardov z znano koncentracijo DNA smo okvirno določili količino DNA v vzorcih. Na podlagi tega smo določili kolikšen del vzorca smo kasneje uporabili v reakcijski mešanici za pomnoževanje delov genov za 16S rRNA (PCR).

### 3.2.4 Izolacija plazmidne DNA z alkalno hidrolizo

V osnovnem protokolu izolacije plazmida z alkalno hidrolizo je zapisano, da se kot izhodno kulturo za izolacijo uporabi 10 ml prekonočne tekoče bakterijske kulture. Zaradi lažje izvedbe smo protokol priredili.

Polno cepilno zanko bakterijske kulture (60-80 mg) izbranih sevov smo postrgali z osnovnih gojišč LB in jih nato resuspendirali v 200 µl ledeno hladne raztopine I. Po 5-minutni inkubaciji v ledeni vodni kopeli smo dodali 400 µl sveže pripravljene raztopine II in previdno premešali z obračanjem. Spet smo inkubirali pri istih pogojih 5-10 minut in nato dodali 300 µl ledeno hladne raztopine III ter premešali z obračanjem. Sledila sta ponovna inkubacija v ledeni vodni kopeli za 3-5 minut in 15-minutno centrifugiranje pri 12.000 vrt./min in 4°C. Po ločitvi faz smo do največ 600 µl vodne faze prenesli v svežo sterilno mikrocentrifugirko in ji dodali enako količino mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol. Zmes smo na kratko vorteksirali in centrifugirali 5 minut pri 8.000 vrt./min pri sobni temperaturi. Odpipetiranemu supernatantu smo dodali enako količino mešanice kloroform-izoamilalkohol ter postopek ponovili. Plazmidno DNA v zgornji vodni fazi smo oborili z dvakratnim volumnom 96-odstotnega etanola pri sobni temperaturi. Sledilo je 15 minutno centrifugiranje pri 12.000

vrt./min in 4°C. Po centrifugiranju smo supernatant odstranili s pipeto, oborini DNA pa dodali 500 µl 80-odstotnega etanola. Centrifugirali smo 5 minut pri 10.000 vrt./min in sobni temperaturi ter nato etanol popolnoma odstranili s pipeto. Če so ob steni mikrocentrifugirke ostale kapljice etanola, smo jo ponovno centrifuirali, a le za nekaj sekund, in previdno odpipetirali preostali etanol. Oborjeno plazmidno DNA smo sušili 10 minut pri 37°C, da je ves alkohol izhlapel, posušeno oborino pa raztopili v 30 µl pufra TE z RNA-zo. Uspešnost izolacije plazmidne DNA smo preverjali z elektroforezo na agaroznem gelu. 3 µl izolirane plazmidne DNA smo nanesli skupaj z nanašalnim pufrom v razmerju 5:1 na 0,9-odstotni agarozni gel. Elektroforeza je potekala pri napetosti 12 V/cm gela, v pufru 1 X TBE približno 30 minut.

### 3.2.5 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverjali prisotnost izolirane genomske in plazmidne DNA, prisotnost in velikost nastalih PCR pomnožkov ter fragmentov DNA po restrikciji. Glede na analizo različne DNA smo pripravili gele z različno gostoto agaroze, od 0,9 - 1,7 %. Gel smo pripravili tako, da smo ustrezeni količini agaroze dodali pufer 1 X TBE ter segrevali, dokler se agaroza ni popolnoma raztopila. Na približno 50 do 60°C ohljenemu gelu, smo dodali etidijev bromid do končne koncentracije v gelu 0,5 µg/ml. Gel smo nato vlili v nosilce in počakali, da se strdi.

Kot označevalec velikosti smo v jamice dodali DNA velikostne standardne, 1 kb ali 50 bp lestvico (Fermentas). V jamice smo vnesli po 3-5 µl genomske DNA, PCR pomnožkov ali dele DNA po restrikciji skupaj z nanašalnim elektroforeznim pufrom v razmerju 5:1. Večje količine vzorca smo nanesli za izrez in čiščenje iz gela. Elektroforeza je večinoma potekala pri napetosti 12 V/cm gela v pufru 1 X TBE približno 30 minut.

Po večini smo pri agarozni elektroforezi uporabljali 0,9-odstotni gel, le pri elektroforezi produktov restrikcije pomnoženih delov genov *qnrB* z *BclI* smo zaradi predvidene majhnosti dobljenih fragmentov uporabili 1,7 -odstotni gel.

Po elektroforezi 1 kb lestvice (1 kb DNA Ladders, Fermentas) zasledimo fragmente sledečih velikosti (v baznih parih): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250. Po elektroforezi 1 kb lestvice (1 kb Plus DNA Ladders, Fermentas) zasledimo fragmente sledečih velikosti: 20000, 10000, 7000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500,

1000, 700, 500, 400, 300, 200 in 75 bp. Po elektroforezi 50 bp lestvice pa so fragmenti veliki: 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100 in 50 bp.

Po končani elektroforezi smo gele presvetlili z UV-svetlobo valovne dolžine 302 nm in jih slikali.

### 3.2.5.1 Elektroforeza izolirane plazmidne DNA skupaj s plazmidom pUC19 z vstavljenimi fragmenti znanih velikosti

Z primerjavo plazmidov izoliranih sevov s plazmidom pUC19 z vstavljenimi fragmenti različnih velikosti (torej je bila velikost celotnega plazmida znana) smo skušali ugotovili okvirne velikosti nerazrezanih izoliranih plazmidov.

## 3.2.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnoževali dele genov za 16S rRNA, s pomočjo katerih smo ugotovili v katere rodove se uvrščajo izolirani sevi. Pomnoževali smo tudi dele genov, ki kodirajo zapise za odpornost proti beta laktamom s širokim spektrom delovanja (ESBL) in kinolonom (*qnr*).

### 3.2.6.1 Priprava vzorčne DNA za izvedbo PCR

Pri sevih, kjer smo izolirali genomsko DNA, smo le-to uporabili pri pomnoževanju genov ali delov genov z verižno reakcijo s polimerazo.

Pri sevih, kjer genomske DNA nismo izolirali, smo pripravili bakterijske lizate. Eno cepilno zanko bakterijske kulture smo prenesli iz trdnega gojišča LB v sterilne mikrocentrifugirke in dodali 1 ml sterilne deionizirane vode. Bakterije smo resuspendirali s kratkim mešanjem na vibracijskem mešalniku. Resuspendirane celice smo segrevali 10 minut v vreli vodi in jih nato centrifugirali 10 minut pri 14.000 vrt./min in sobni temperaturi. Supernatant, v katerem je celokupna celična DNA, smo uporabili kot vzorčno DNA pri verižni reakciji s polimerazo.

### 3.2.6.2 Začetni oligonukleotidi za PCR

V preglednici so prikazani začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genov ali njihovih delov.

**Preglednica 5.** Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri verižni reakciji s polimerazo, njihovo nukleotidno zaporedje in velikost pomnožka, ki nastane pri PCR.

oznaka začetnega oligonukleotida	nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov (5'-3')	velikost PCR pomnožka [bp]
QnrAm-F	AGAGGATTCTCACGCCAGG	580
QnrAm-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	
QnrBm-F	GGMATHGAAATTGCCACTG <sup>a</sup>	264
QnrBm-R	TTTGCYGYCGCCAGTCGAA <sup>a</sup>	
QnrSm-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428
QnrSm-R	TCTAACCGTCGAGTCGGCG	
QnrC F	GGGTTGTACATTATTGAATCG	447
QnrC R	CACCTACCCATTATTTC	
Qac 1(F)	GGCATCACTGCGTGTGCTCG	514
Qac 2(R)	GAUTGAGCATGACCTTGCG	
PANCTX-M.F	TTTGCATGTGCAGTACCAAGTAA	543
PANCTX-M.R	CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	
SHV.F	GGGTTATTCTTATTGTCGC	927
SHV.R	TTAGCGTTGCCAGTGCTC	
TEM.F	ATAAAATTCTGAAGACGAAA	1079
TEM.R	GACAGTTACCAATGCTTAATCA	
DHA-1A	CTGATGAAAAAATCGTTATC	1056
DHA-1B	ATTCCAGTGCACCAAATA	
fd1	AGAGTTGATCCTGGCTCA	1399
1392	ACGGGCGGTGTGTRC	
Arh1	GTGCTCCCCGCCAATTCT	492
1392	ACGGGCGGTGTGTRC	

a-M = A ali C, H = A ali C ali T, Y =C ali T, R= A ali G

### 3.2.6.3 Sestava reakcijskih mešanic za PCR

- *Reakcijska mešanica za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij gena za 16S rRNA*

Reakcijska mešanica je vsebovala 25 µl PCR Master mix-a (Fermentas), po 2 µl posameznega začetnega oligonukleotida z oznako fd1 in 1392, od 0,3 µl do 5 µl izolirane genomske DNA odvisno od njene koncentracije, okvirno določene z agarozno gelsko elektroforezo. Do

končnega volumna rekacijske mešanice, ki je bil 50 µl, smo dodali ustrezno količino sterilne deionizirane vode.

- *Reakcijska mešanica za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov s primerji panCTX, TEM, SHV in DHA*

Reakcijska mešanica je vsebovala 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida F (10 pmol/ml), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida R (10 pmol/ml), 1 µl genomske DNA ali 2 µl bakterijskega lizata in 9,5 µl deionizirane vode, če smo uporabili genomsko DNA, oz. 8,5 µl deionizirane vode, če smo uporabili bakterijski lizat. Ta PCR smo naredili le za seve, ki so rasli na cefotaksimu.

Z agarozno gelsko elektroforezo smo potrdili, ali smo z reakcijo PCR dobili ustrezno velike pomnožke, ki smo jih nato izrezali iz gela, jih očistili s kompletom za čiščenje pomnožkov reakcije PCR in jim določili nukleotidno zaporedje.

- *Reakcijska mešanica za pomnoževanje nukleotidnih zaporedji delov genov qnrA, qnrB, qnrC in qnrS (multipleks PCR)*

Reakcijska mešanica je vsebovala 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas), 1 µl vsakega začetnega oligonukleotida QnrAm-F, QnrAm-R, QnrBm-F, QnrBm-R, QnrSm-F, QnrSm-Rm, QnrC F, QnrC R (10 pmol/µl), 2,5 µl bakterijskega lizata in 2 µl deionizirane vode.

- *Reakcijska mešanica za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov aac(6')-Ib in aac(6')-Ib-cr, qnrB, qnrC ter qnrS*

Reakcijska mešanica je vsebovala 12,5 µl PCR Master mix-a (Fermentas), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida F (10pmol/ml), 1 µl izbranega začetnega oligonukleotida R (10pmol/ml), 2 µl bakterijskega lizata in 8,5 µl deionizirane vode.

Z agarozno gelsko elektroforezo smo potrdili, ali smo pri verižni reakciji z polimerazo dobili ustrezno velike pomnožke. Pri sevih, pri katerih smo dobili ustrezno velik pomnožek, smo leta izrezali iz gela, očistili s kompletom in določili zaporedje nukleotidov.

### 3.2.6.4 Pogoji pomnoževanja s PCR

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov za 16S rRNA:

začetna denaturacija	95°C	4 minute	1x
denaturacija	94°C	30 sekund	30x
prileganje začetnih oligonukleotidov	60°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	90 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1x

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov s parom začetnih oligonukleotidov panCTX, TEM in SHV:

začetna denaturacija	95°C	5 minute	1x
denaturacija	94°C	30 sekund	30x
prileganje začetnih oligonukleotidov	50°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	80 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1x

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov s parom začetnih oligonukleotidov DHA:

začetna denaturacija	95°C	5 minute	1x
denaturacija	94°C	30 sekund	30x
prileganje začetnih oligonukleotidov	45°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	90 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1x

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* in *qnrS* (multipleks PCR) in delov genov *qnrB* ter *qnrS*:

začetna denaturacija	95°C	4 minute	1x
denaturacija	94°C	30 sekund	30x
prileganje začetnih oligonukleotidov	54°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1x

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij genov delov genov *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr*:

začetna denaturacija	95°C	3 minute	1x
denaturacija	94°C	30 sekund	30x
prileganje začetnih oligonukleotidov	50°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1x

- Pogoji za pomnoževanje nukleotidnih zaporedij delov genov *qnrC*:

začetna denaturacija	95°C	4 minute	1x
denaturacija	94°C	30 sekund	30x
prileganje začetnih oligonukleotidov	50°C	30 sekund	
pomnoževanje	72°C	45 sekund	
končno pomnoževanje	72°C	7 minut	1x

### 3.2.7 Čiščenje s PCR pomnoženih fragmentov DNA

- Izrez in čiščenje fragmentov iz gela s kompletom *QIAquick Gel Extraction Microcentrifuge and Vacuum Protocol (Fermentas)*

Z elektroforezo na agaroznih gelih smo ločili različne PCR pomnožke, ki so nastali pri verižni reakciji s polimerazo. Na gel smo nanesli 2 x 25 µl PCR mešanice. S pomočjo sterilnega skalpela smo ustrezni DNA fragment izrezali iz agaroznega gela. Čiščenje PCR-pomnožkov smo nato nadaljevali po navodilih proizvajalca. Da bi preverili uspešnost čiščenja ter približno koncentracijo očiščenih pomnožkov, smo manjšo količino nanesli skupaj z nanašalnim pufrom na 0,9-odstotni agarozni gel in ločevali pri napetosti 12 V/cm gela, v pufru 1 X TBE.

Pri delu smo izrezali in očistili:

- PCR-pomnožke delov genov za 16S rDNA
  - PCR-pomnožke z začetnimi oligonukleotidi panCTX, TEM, SHV in DHA
  - izolirano plazmidno DNA manjših plazmidov
- 
- Izrez in čiščenje fragmentov iz gela z kompletom *DNA Extraction Kit #K0513 (Fermentas)* - predstavljeno v poglavju 3.2.9 Kloniranje
  - Direktno čiščenje pomnožkov genov za 16S rRNA, kjer je bil prisoten le en fragment, s kompletom *QIAquick PCR Purification Protocol using a microcentrifuge (QIAGEN)*

Očiščene fragmente smo poslali na sekvenciranje v Microsynth-Balgach (Švica), kjer so določili njihovo zaporedje nukleotidov. Dobljena zaporedja smo analizirali z računalniškimi programi Classifier in Seq match, ki so dostopni na RDP (ribosomal database project) internetni strani (<http://rdp.cme.msu.edu/>) in tako izolirane seve razvrstili v rodove.

### 3.2.8 Restrikcija

#### 3.2.8.1 Restrikcija očiščene plazmidne DNA z encimi Fast digest *EcoRI*, Fast digest *HindIII*, Fast digest *PstI* in *SalI*

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 8 µl očiščene plazmidne DNA, po 1 µl posameznega encima, Fast digest *EcoRI*, Fast digest *HindIII*, Fast digest *PstI* ali *SalI* in 1 µl ustrezne pufre za restrikcijo (Fermentas). Restrikcijsko mešanico s Fast digest encimi smo centrifugirali in nato inkubirali 20 minut pri 37°C, restrikcijske mešanice, ki so bile

pripravljene z navadnim encimom pa smo inkubirali 1 uro pri enaki temperaturi. Pokrove mikrocentrifugirk smo obdali s parafilmom, da smo preprečili morebitno izhlapevanje tekom inkubacije. Restrikcijske mešanice smo z nanašalnim pufom nanesli na 0,9-odstotni agarozni elektroforezni gel. Kot merilo velikosti smo uporabili 1 kb lestvico (1 kb Plus DNA Ladders). Elektroforeza fragmentov je potekala približno pri 12 V/cm gela v pufru 1 X TBE.

Pri tem smo skušali poiskat encim, ki bi plazmidno DNA rezal le enkrat, da bi dobili en fragment, ki bi ga nato očistili in poskusili klonirati - z vektorjem prenesti v bakterijo *E.coli* in v njej pomnožiti.

### 3.2.8.2 Restrikcija PCR pomnožkov delov genov *qnrB* z encimom *BcII*

V sterilne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 3 µl neociščenega PCR pomnožka, 1 µl encima *BcII*, 1 µl ustreznegra pufra za restrikcijo (Fermentas) in 5 µl deionizirane vode. Restrikcija je potekala preko noči pri 50°C. Pokrove mikrocentrifugirk smo obdali s parafilmom, da smo preprečili morebitno izhlapevanje tekom inkubacije. Produkte restrikcije smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo na 1,7-odstotnem agaroznem elektroforeznem gelu. Kot merilo velikosti za nastale fragmente smo uporabili 50 bp lestvico (50 bp DNA Ladders).

Za nadaljno potrditev prisotnosti genov *qnrB* smo fragmente izrezali iz gela, očistili in poslali sekvencirati.

## 3.2.9 Kloniranje

Pri kloniranju »izrežemo« del DNA iz prvotnega genoma in ga, običajno na vektorju, prenesemo v drug organizem, kjer se pomnoži. Tako dobimo veliko število kopij posameznega dela DNA ali gena. V okviru diplomske naloge smo na ta način skušali povečati število kopij plazmidne DNA, ki smo jo izolirali iz izbranih sevov. Večje število kopij določenega fragmenta plazmidne DNA bi nam omogočilo s sekvenciranjem določiti njihovo natančno sestavo, zaporedje nukleotidov.

### 3.2.9.1 Popolna restrikcija očiščene plazmidne DNA sevov S2 in S4 iz rodu *Shewanella* z Fast digest *EcoRI*, Fast digest *PstI* ter Fast digest *HindIII*

Pri izbranih izoliranih sevih z »majhnimi« plazmidi smo razrezali očiščeno plazmidno DNA s tremi encimi, *EcoRI*, *PstI* in *HindIII*. V sterilne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 8 µl očiščene plazmidne DNA izbranih sevov, 1 µl posameznega encima in 1 µl ustreznegra pufra za restrikcijo (Fermentas). Restrikcijske mešanice smo centrifugirali in nato preko noči inkubirali pri 37°C. Nato smo jih z nanašalnim pufom (razmerje 5:1) nanesli na 0,9-odstotni

agarozni elektroforezni gel. Kot merilo velikosti smo uporabili 1 kb lestvico (1 kb Plus DNA Ladders). Elektroforeza fragmentov je potekala pri 12 V/cm gela v pufru 1 X TBE. Pri dveh očiščenih plazmidih seva S2 iz rodu *Shewanella* (2. in 3.plazmid) smo pri restrikciji s *PstI* dobili ustrezeno velike produkte glede na velikost nerazrezanega plazmida. Te fragmente smo nato očistili in ustavili v plazmid pUC19.

### 3.2.9.2 Popolna restrikcija plazmidnega vektorja pUC19 z encimom *PstI*

V sterilne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 3 µl plazmida pUC19, 1 µl encima *PstI* (Fermentas), 1 µl ustreznega pufra za restrikcijo (Fermentas) in 5 µl deionizirane vode. Restrikcionsko mešanico smo centrifugirali in nato inkubirali 20 minut pri 37°C.

### 3.2.9.3 Čiščenje razrezanih produktov

Kjer je bil po agarozni gelski elektroforezi razrezane očiščene plazmidne DNA več kot en produkt, smo ustrezeno velike produkte iz gela izrezali in očistili s kompletom DNA Extraction Kit #K0513 (Fermentas), po navodilih proizvajalca. (2. plazmid seva S2 iz rodu *Shewanella*). Kjer je bil produkt le eden, smo pri nadalnjem delu (za ligacijo razrezanega plazmida z razrezanim vektorjem) uporabili kar celotne restrikcionske mešanice (3. plazmid seva S2 iz rodu *Shewanella*, plazmid pUC19).

### 3.2.9.4 Priprava kompetentnih bakterijskih celic DH5 (*E. coli*)

Dve polni sterilni cepilni zanki sveže bakterijske kulture *E.coli* DH5 smo precepili v 20 oz. 40ml svežega, na 37°C ogretega tekočega gojišča LB. Precepljeno kulturo smo inkubirali na rotacijskem stresalniku pri 37°C, dokler ni dosegla zgodnje ali srednje faze logaritemske rasti, kar smo ugotovili z optično gostoto. Ta naj bi bila pri valovni dolžini 590 nm 0,3759. Ko je bakterijska kultura dosegla tako gostoto, smo z inkubacijo prenehali, odpipetirali po 1 ml kulture v 4 sterilne mikrocentrifugirke in inkubirali 10 minut v ledeni vodni kopeli. Ohlajeno bakterijsko kulturo smo centrifugirali 2 minuti pri 12.000 vrt./min in 4°C ter nato odstranili supernatant. Bakterijsko usedlino smo resuspendirali v 500 µl ledeno hladne raztopine CaCl<sub>2</sub> in inkubirali 10 minut v ledeni vodni kopeli. Po inkubaciji smo bakterijske celice ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Nato smo previdno odlili supernatant in usedlino bakterij resuspendirali v 500 µl ledeno hladne raztopine CaCl<sub>2</sub> in inkubirali 5 minut v ledeni vodni kopeli. Po inkubaciji smo bakterijske celice ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Nato smo ponovno odlili supernatant, sprane bakterijske celice ponovno resuspendirali v 500 µl ledeno hladne raztopine CaCl<sub>2</sub> in ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Spet smo odlili supernatant in bakterijske celice resuspendirali v 50 µl ledeno hladne raztopine CaCl<sub>2</sub>.

### 3.2.9.5 Ligacija fragmenta izolirane plazmidne DNA s plazmidom pUC19

Če smo razrezano plazmidno DNA izrezali iz gela in očistili, smo v sterilne mikrocentrifugirke odpipetirali 10 µl razrezane plazmidne DNA izbranega izolata, 2 µl razrezanega plazmida pUC19, 1,5 µl encima ligaza T4, 4 µl ustreznega pufra za ligazo in 2,5 µl deionizirane vode.

Če pa smo uporabili razrezano plazmidno DNA direktno iz restrikcijske mešanice, smo v sterilne mikrocentrifugirke odpipetirali 7 µl razrezane plazmidne DNA izbranega izolata, 2 µl razrezanega plazmida pUC19, 1,5 µl encima ligaza T4, 4 µl ustreznega pufra za ligazo in 5,5 µl deionizirane vode. Pokrove mikrocentrifugirk smo obdali s parafilmom in pustili preko noči v vodni kopeli pri 22°C. Za vsak razrezen očiščen plazmid izoliranih sevov smo pripravili po dve ligacijski mešanici.

### 3.2.9.6 Transformacija

V sterilno mikrocentrifugirko smo odpipetirali 10 µl ligacijske mešanice in 50 µl pripravljenih kompetentnih baktrijskih celic *E.coli* ter premešali z avtomatsko pipeto. Transformacijsko mešanico smo inkubirali 10 minut v ledeni vodni kopeli. Sledil je temperaturni šok, saj smo mikrocentrifugirke s transformacijsko mešanicijo inkubirali 2 minuti v vodni kopeli pri 42°C. Nato smo v mikrocentrifugirke dodali 0,5 ml tekočega gojišča LB in jih inkubirali 45 minut v vodni kopeli pri 37°C. Med tem časom smo jih večkrat premešali. Po inkubaciji smo odpipetirali po 50 µl in 100 µl mešanice na selekcijsko gojišče - gojišče LB z dodanim ampicilinom in Xgal-om ter jih s sterilno stekleno palčko enakomerno razmazali. S tem smo selekcionirali kolonije z rekombinantnimi plazmidi (te so bile na selekcijskih gojiščih obarvane belo; modro obravane kolonije pa so vsebovale nerekombinantne plazmide – vektor pUC19 brez vstavljenega fragmenta).

## 3.2.10 Iskanje klonov z rekombinantnimi plazmidi

### 3.2.10.1 Izolacija rekombinantne plazmidne DNA s CTAB in tritonom X-100 ter ugotavljanje velikosti vstavljenega fragmenta (kloniranega dela plazmidne DNA)

V osnovnem protokolu izolacije plazmidne DNA s CTAB in tritonom X-100 je zapisano, da se kot izhodno kulturo za izolacijo uporabi 10 ml prekonočne tekoče bakterijske kulture (tekoče gojišče LB z ampicilinom, 100 µg/ml). Zaradi lažje izvedbe smo protokol priredili.

Polno cepilno zanko bakterijske kulture (60-80 mg) izbranih sevov smo postrgali z gojiščem LB z dodanim ampicilinom in Xgal-om in jih nato resuspendirali v 200 µl pufra STET. Po dodatu 4 µl lizocima smo vse skupaj previdno premešali in inkubirali 5 minut pri sobni

temperaturi. Mikrocentrifugirke smo postavili v stiropornem nosilcu za 45 sekund v vrelo vodo in jih nato centrifugirali 10 minut v namizni centrifugi pri 12.000 vrt./min. Percipitat smo odstranili s sterilnim zobotrebcem in supernatantu dodali 8 µl raztopine CTAB. Mikrocentrifugirko smo nekajkrat obrnili in jo centrifugirali 5 minut pri sobni temperaturi. Odpipetirali smo supernatant in nastalo oborino resuspendirali v 300 µl 1,2M NaCl in dodali 750 µl 96-odstotnega hladnega etanola. Po 10-minutnem centrifugiranju pri enakih pogojih smo supernatant odpipetirali in oborino splaknili z 500 µl 80-odstotnega etanola. Spet smo centrifugirali in s pipeto odstranili ostanke etanola. Oborino smo v odprti mikrocentrifugirki sušili 10 minut pri 37°C. Izolirano plazmidno DNA smo raztopili v 30 µl pufra TE z RNA-zo. Uspešnost izolacije plazmidne DNA smo preverili tako, da smo jo 3 µl nanesli skupaj z nanašalnim pufrom na 0,9-odstotni agarozni gel in ločevali pri napetost 12V/cm gela v pufru 1 X TBE. Kot merilo velikosti smo uporabili 1 kb lestvico (1 kb Plus DNA Ladders).

### 3.2.10.2 Restrikcija z encimom *PstI*

Z restrikcijo smo skušali ugotoviti velikosti vstavljenega fragmenta. V sterilne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 4 µl rekombinantne plazmidne DNA izbranih sevov, 2 µl encima Fast digest *PstI*, 1 µl ustreznegra pufra za restrikcijo (Fermentas) in 3 µl deionizirane vode. Restriktijske mešanice smo centrifugirali in nato inkubirali 20 minut pri 37°C. Restriktijske mešanice smo z nanašalnim pufrom nanesli na 0,9-odstotni agarozni elektroforezni gel. Kot merilo velikosti smo uporabili 1 kb lestvico (1 kb Plus DNA Ladders). Elektroforeza fragmentov je potekala pri 12 V/cm gela v pufru 1 X TBE.

### 3.2.11 Konjugacija

S konjugacijo smo skušali plazmide iz izoliranih sevov prenesti v definirane recipientske seve bakterije *E.coli*. Na trdno gojišče BHI smo na gosto razmazali polno cepilno zanko proti natrijevemu azidu odpornega recipientskega seva *E. coli* J53 Az<sup>r</sup>. Preko tega seva smo razmazali polno cepilno zanko posameznega donorskega seva, pri katerem smo uspeli izolirati plazmide. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37°C. Naslednji dan smo polno cepilno zanko zraslih bakterij precepili na trdna selektivna gojišča LB z natrijevim azidom (s čimer smo preprečili rast donorja) in ampicilinom (s čimer smo selekcionirali transkonjugante in preprečili rast samega recipientskega seva). Plošče smo inkubirali 2 dni pri 37°C. Zrasle kolonije smo s cepilno zanko precepili na enaka sveža gojišča in zopet inkubirali 2 dni pri 37°C. Bakterijske kulture smo še enkrat precepili, prav tako na selektijskih gojiščih.

### **3.2.12 Identifikacija ESBL producirajočih sevov z difuzijsko metodo z diskami in E testi**

Pri ESBL producirajočih sevih naj bi se ob dodatku klavulanske kislino k določeni protimikrobnim učinkovinam (večinoma se pri tej metodi uporablja cefotaksim ali ceftazidim) koncentraciji povečala glede na konički pri sami protimikrobnim učinkovinam. Klavulanska kislina je sposobna zavirati beta-laktamaze, encime, ki jih ESBL producirajoče bakterije proizvajajo in z njimi zavirajo delovanje betalaktamskih antibiotikov.

Za ugotavljanje prisotnosti ESBL producirajočih sevov smo uporabili difuzijsko metodo z diskami, in sicer v dveh kombinacijah, ceftazidim (CAZ) in ceftazidim s klavulanskim kislino (CAZ/CLA) za nekatere seve ter cefotaksim s klavulanskim kislino (CT/CLA) za druge. Pri slednjem smo za primerjavo upoštevali podatke pridobljene pri ugotavljanju rasti sevov na ploščah z cefotaksimom (CT). Za izbrane seve, ki so dali ustrezne rezultate pri difuzijski metodi z diskami, smo naredili še E test s cefotaksimom in cefotaksimom z klavulanskim kislino (CT/CTL) ter odčitali minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

Za difuzijsko metodo z diskami smo kot je opisano pri točki 4.2.2.6 enakomerno razmazali bakterijske kulture na trdno gojišče MH. Na vsako ploščo smo dali po dva diska – CAZ in CAZ/CLA ali le enega CT/CLA.

Pri E testih smo na podoben način razmazali bakterijske kulture, a tokrat na trdno gojišče LB. Postopek priprave je bil enak kot pri točki 4.2.2.6. Na sredino tako pripravljenega gojišča smo položili trakec z gradientom koncentracije CT na eni in CT/CLA na drugi strani. Po prekonočni inkubaciji pri 19°C smo pregledali konički lize in odčitali minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) posameznih snovi.

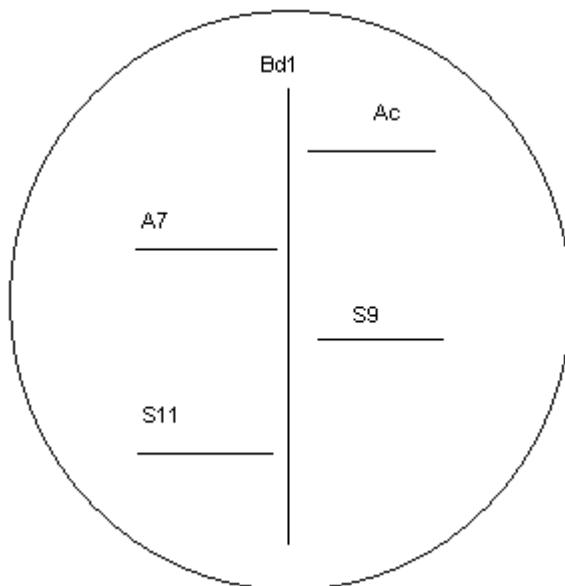
Vse metode so bile opravljene po navodilih mednarodnega inštituta za klinične standarde (CLSI). Na podlagi teh smo določili konički lize in minimalne inhibitorne koncentracije.

### **3.2.13 E testi za moksifloksacin**

Za nadaljnje razlikovanje med sevi znotraj posameznih rodov smo uporabili E teste za moksifloksacin, pri čemer smo ugotavljali minimalne inhibitorne koncentracije za posamezne izolirane seve. Postopek priprave E testa za moksifloksacin je enak kot pri prejšnji točki.

### 3.2.14 Ugotavljanje povzročiteljev zaviranja rasti izoliranega seva iz rodu *Bacillus* skupine d

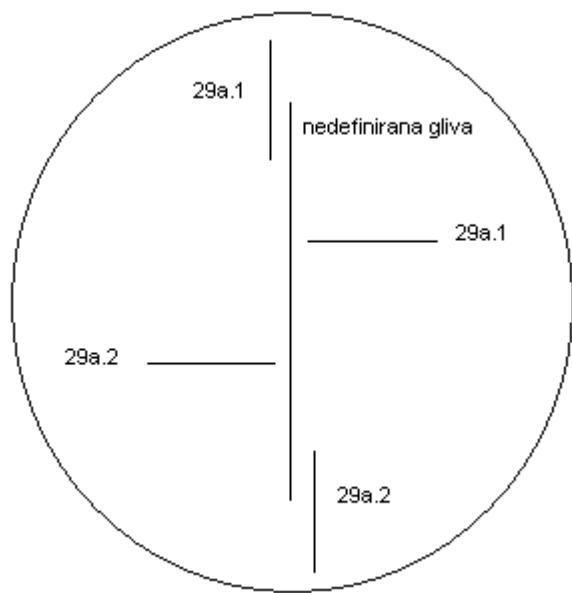
Na prvotnih ploščah smo opazili, da je eden izmed sevov zaviral rast drugega seva. Sev, katerega rast je bila zavrta, je bil sev Bd1 iz rodu *Bacillus* skupine d. Na isti plošči so rasli tudi sev Ac iz rodu *Acinetobacter*, sev A7 iz rodu *Aeromonas* ter seva S9 in S11, ki sta bila glede na morfologijo določena za pripadnika rodu *Shewanella*. Da bi ugotovili, kateri od teh zavira rast seva Bd1, smo s sterilno cepilno zanko zajeli bakterijsko kulturo seva Bd1 in ga razmazali v črti čez sredino plošče gojišča LB. Prečno na sev Bd1 smo v razdalji 3-4 mm od tega seva proti robu petrijevke nacepili preostale seve s prvotne plošče. Po dvodnevni inkubaciji pri 19°C smo ocenili kateri sev zavira rast seva Bd1 iz rodu *Bacillus* skupine d.



**Slika 5.** Shematski prikaz razmaza sevov na isto ploščo gojišča LB pri preverjanju vpliva drugih sevov na rast seva Bd1 iz rodu *Bacillus* skupine d.

### 3.2.15 Ugotavljanje protiglivnega delovanja

Na eni izmed prvotnih plošč z izolati iz ust močerila smo zasledili zaviranje rasti nedefinirane glive, ki je prav tako zrasla na tej plošči. Da bi to potrdili, smo glivo skupaj s sevoma Al2 iz rodu *Alcaligenes* in Bd3 iz rodu *Bacillus* skupine d, ki sta se pojavila na tej plošči nanesli na novo trdno gojišče LB, kot je opisano v prejšnji točki. Pri precepljanju glive smo sterilno cepilno zanko prej pomočili v fiziološko raztopino, tako da smo omejili prenašanje spor. Delo je potekalo v laminariju.



**Slika 6.** Shematski prikaz razmaza sevov in nedefinirane glive na isto ploščo gojišča LB pri preverjanju vpliva sevov na rast glive.

### 3.2.16 Shranjevanje sevov

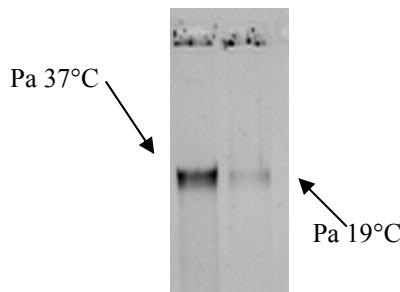
Bakterijske kulture smo s sterilno cepilno zanko nacepili v 10 ml tekočega gojišča LB v epruvetah. Epruvete smo inkubirali v rotacijskem stresalniku pri temperaturi 28°C dva dni oz. dokler ni bilo gojišče motno. V mikrocentrifugirke namenjene shranjevanju sevov pri -80°C, smo odpipetirali 500 ml v tekočem gojišču LB zrasle bakterijske kulture in 500 ml raztopine Tris Glicerol MgSO<sub>4</sub> ter premešali z avtomatsko pipeto. Mikrocentrifugirke smo nato za približno 1 minuto potopili v tekoči dušik (-196°C). Tako zmrznjene seve smo shranili v zmrzovalniku na -80°C.

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRISOTNOST RODOV BAKTERIJ V PREBAVILIH ČLOVEŠKE RIBICE

Ugotavljali smo prisotnost in pestrost aerobnih heterotrofnih rodov, ki so zrasli na gojiščih LB. Na originalnih ploščah, na katere smo razmazali po eno cepilno zanko oz. vatenko vzorcev, vzetih s posameznih predelov prebavil, sta prevladovala dva morfološko različna tipa kolonij, ki smo jih kasneje na osnovi nukleotidnega zaporedja delov genov za 16S rRNA uvrstili v rodovala *Aeromonas* in *Shewanella*.

Za določitev sekvenc delov genov za 16S rRNA s pomočjo katerih smo seve identificirali do rodov, smo morali najprej izolirati genomske DNA. Z izolacijo DNA iz sevov, ki so rasli pri različnih temperaturah smo skušali samo izolacijo optimizirati in tako pridobiti zadostne količine kvalitetne DNA. Pri sevu Pa iz rodu *Paenibacillus* smo dobili boljši izkoristek, torej večjo količino DNA pri izolaciji iz bakterijskih kultur, ki so zrasle pri temperaturi 37°C (običajno so sevi rasli pri 19°C).



Slika 7. Izolirana genomska DNA iz seva Pa iz rodu *Paenibacillus*, ki je rasel pri temperaturi 19°C in 37°C.

Pri sevih A6 in A9 iz rodu *Aeromonas* se je zgodilo obratno in je bil boljši izkoristek pri izolaciji DNA iz bakterijskih kultur, ki so zrasle pri 19°C. Pri izolaciji DNA iz bakterijskih kultur teh sevov, ki so zrasle pri 37°C, se je pojavil razmazan, nejasen fragment.

**Preglednica 6.** Rodovi, izolirani iz prebavil človeške ribice (*Proteus anguinus*) in njihova uvrstitev.

	<b>razred</b>		<b>red</b>	<b>rod</b>
po Gramu negativne	"Actinobacteria"	Actinobacteria	Actinomycetales	<i>Oerskovia</i>
	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	<i>Ochrobactrum</i>
		Betaproteobacteria	Burkholderiales	<i>Achromobacter</i>
				<i>Alcaligenes</i>
		Gammaproteobacteria	Aeromonadales	<i>Aeromonas</i>
			Alteromonadales	<i>Shewanella</i>
		Enterobacteriales	<i>Serratia</i>	
		Pseudomonadales	<i>Acinetobacter</i>	
po Gramu pozitivne	Firmicutes	"Bacilli"	Bacillales	<i>Bacillus sk. a</i>
				<i>Bacillus sk. d</i>
				<i>Paenibacillus</i>
				<i>Staphylococcus</i>

Izolirali smo predstavnike iz dvanajstih različnih rodov. Večina rodov je spadala v razred Proteobacteria (po Gramu negativne bakterije), več pa je bilo tudi rodov iz razreda Firmicutes (po Gramu pozitivne bakterije).

Večina izoliranih sevov je pripadala rodovom *Aeromonas*, *Shewanella*, *Serratia* in *Bacillus* skupine d. Fenotipske lastnosti smo preverjali za večino izoliranih sevov teh rodov. Nekaj je bilo tudi predstnikov drugih rodov, pri katerih sta bila izolirana po največ dva seva iz posameznega rodu. Od izolatov iz teh rodov smo zaradi pomanjkanja sredstev preverjali fenotipske lastnosti le za en izoliran sev. Vseh izoliranih sevov različnih rodov pri katerih smo preverjali fenotipske lastnosti je bilo 48. Od tega jih je bila večina (85 %) po Gramu negativnih.

Identifikacija nekaterih sevov iz prvotnih plošč nam ni uspela. 11 sevov po precepu iz prvotnih plošč na trdnih gojiščih LB ni raslo in so tako ostale le posamezne kolonije na prvotnih ploščah. Teh sevov nismo mogli morfološko določiti in jih ustrezno karakterizirati. 17 sevov pa je tekom poskusa nehalo rasti (imeli smo le čiste kulture na starejših ploščah). Dva od teh sevov smo uspešno določili s pomočjo sekvenciranja, za preostalih 15 so znani le podatki o hemolitičnosti, tako da tudi teh sevov nismo mogli ustrezno karakterizirati.

#### 4.2 ŠTEVILLO IZOLATOV IZ POSAMEZNIH RODOV GLEDE NA MESTO IZOLACIJE

Preglednica 7. Razporeditev izolatov iz posameznih rodov glede na mesto izolacije.

rod/mesto izolacije	usta	požiralnik	želodec	dvanajsternik	tanko črevo	debelo črevo
<i>Achromobacter</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Aeromonas</i>	0	2	2	1	0	16
<i>Alcaligenes</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Bacillus sk.a</i>	0	0	0	0	0	2
<i>Bacillus sk.d</i>	1	0	0	1	0	4
<i>Ochrobacter</i>	1	0	0	1	0	0
<i>Oerskovia</i>	0	0	0	0	1	0
<i>Paenibacillus</i>	0	0	0	1	0	0
<i>Serratia</i>	0	3	4	2	0	2
<i>Shewanella</i>	0	1	0	0	0	14
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	2	0	0

Največje število različnih rodov in različnih izolatov znotraj posameznih rodov smo izolirali iz debelega črevesa. Prav tako je na prvotnih ploščah največ bakterijskih kolonij zraslo na ploščah, kjer smo nacepili vzorce iz debelega črevesa. Večinoma so to bile kolonije iz rodov *Aeromonas* in *Shewanella*.

Iz ust smo izolirali sev iz rodu *Achromobacter*, ki ga v preostalem delu prebavil nismo zasledili. Iz ust smo izolirali tudi sev iz rodu *Ochrobacter*, ki se je pojavil tudi med sevi izoliranimi iz dvanajsternika. Sev iz rodu *Paenibacillus* smo izolirali le iz dvanajsternika.

Predstavnike nekaterih rodov smo izolirali iz različnih delov prebavil, le da se je število različnih sevov teh rodov in predvideno tudi njihova pogostost (količina bakterij na prvotnih ploščah) povečala v debelem črevesu. Ti rodovi so *Aeromonas*, *Bacillus* sk. d in *Shewanella*. Predstavnike nekaterih rodov pa smo iz različnih predelov prebavil izolirali le enkrat ali dvakrat. O njihovi razporeditvi oz. pogostosti je zato težje govoriti (rod *Paenibacillus*, *Oerskovia* in delno tudi *Staphylococcus*, *Bacillus* sk. a in *Alcaligenes*).

#### 4.3 UGOTAVLJANJE PESTROSTI ZNOTRAJ POSAMEZNIH RODOV NA PODLAGI NEKATERIH FENOTIPSKIH LASTNOSTI

##### 4.3.1 Hemolitična aktivnost, rast na gojiščih z hitinom (H) ali karboksimetil celulozo (CMC) in pri različnih temperaturah

S hemolitično aktivnostjo, rastjo na gojiščih s hitinom ali karboksimetil celulozo in pri različnih temperaturah smo ugotavljali razlike med izoliranimi sevi in pestrost znotraj posameznih rodov. Od sevov, ki so si bili na podlagi izbranih fenotipskih lastnosti podobni, smo v rezultatih podali podatke le za enega izmed dveh med seboj podobnih sevov.

**Preglednica 8.** Rast izoliranih sevov iz rodu *Aeromonas* na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.

	A1 vp	A2 vp	A3	A4 vp	A5 vp	A6	A7 vp	A8	A9	A10 vp	A11	A12	A13	A14	A15	A16
<i>Hem</i>	+++	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	++	++
<i>H1</i>	+++	++	+++	+	++	+++	+	NT	++	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>CMC1</i>	++	(+)	+++	++	++	-	+	NT	+++	++	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>H2</i>	++	++	+	++	++	+++	NT	NT	+++	(++)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>CMC2</i>	++	(+)	(+)	(+)	(+)	++	NT	NT	(++)	(++)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
7°C – 1 dan	(+)	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	(+)
7°C – 5 dan	+++	-	+++	+	+++	+++	+++	(+)	+++	+++	+	+++	+	+++	+++	+++
15°C – 1 dan	-	-	++	-	+	++	++	-	+	++	-	+	-	+	++	+
15°C – 5 dan	++	+	+++	++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

**Legenda:** Rast na različnih gojiščih C1 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; H1 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; C2 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarozu kot sredstvom za trdno gojišče; H2 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarozo kot sredstvom za trdno gojišče. Rast na C1, C2, H1, H2; rast pri 7°C in 15°C +++ najboljša rast, ++ srednja rast, + slabša rast, - ni rasti. Rast pri 30°C in 37°C + rast, - ni rasti . Hem – rast na krvnem agarju: +++ močnejša hemoliza, + hemoliza. NT – ni testirano. Vp - “velik” plazmid, Mvp - “majhen” in “velik” plazmid. Oklepaji pomenijo nekoliko slabšo rast kot jo nakazujejo znaki v oklepaju.

Izmed devetnajstih izoliranih sevov iz rodu *Aeromonas* jih je bilo šestnajst med seboj različnih. Seve A1-A10 smo določili na osnovi sekvenc delov genov za 16S rRNA, seve A11-A16 pa na podlagi morfološke podobnosti z znanim, do rodu določenimi sevom in barvanjem po Gramu. Diverziteta znotraj tega rodu je bila dokaj velika.

Testirani sevi iz rodu *Aeromonas* so bili večinoma hemolitični (63 %), pri čemer se je izrazitejša hemoliza pojavila pri 19 % izolatov. Skoraj vsi obravnavani sevi so rasli na gojiščih s karboksimetil celulozo ali hitinom kot edinim virom ogljika in agarjem ali agarozo kot sredstvom za trdno gojišče, le da na gojiščih z agarozo nekoliko slabše.

Pri temperaturi 7°C je bila rast po enem dnevu slaba, slabo oz. zelo slabo je zraslo 31 % različnih sevov rodu *Aeromonas*. Ostali sevi pri tej temperaturi po enodnevni inkubaciji niso zrasli. Po petih dneh pri temperaturi 7°C ni zrasel le en sev, medtem ko se je slabša rast pojavila pri 25 % sevov. Pri 15°C je po enem dnevu zraslo 72 % sevov. Po petih dneh so pri tej temperaturi rasli vsi sevi. Slabša rast se je pojavila le pri dveh sevih. Vsi obravnavani sevi so rasli pri temperaturi 30°C, pri 37°C pa le 69 % sevov.

**Preglednica 9.** Rast izoliranih sevov iz rodu *Shewanella* na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.

	S1 <i>mvp</i>	S2 <i>vp</i>	S3 <i>mvp</i>	S4 <i>vp</i>	S5 <i>mvp</i>	S6 <i>vp</i>	S7 <i>vp</i>	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
<i>Hem</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>H1</i>	(+)	+	-	NT	++	NT	(+)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	++
<i>CMC1</i>	+	+	-	NT	+	NT	(+)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	++
<i>H2</i>	(+)	+	NT	NT	(+)	NT	+	NT						
<i>CMC2</i>	(+)	+	NT	NT	-	NT	-	NT						
7°C – 1 dan	++	??	-	-	-	-	-	+	(+)	++	-	-	NT	+
7°C – 5 dan	+++	??	+++	+++	+++	++	+	+++	++	+++	+	+++	NT	++
15°C – 1 dan	++	+	++	+	-	-	-	-	+++	+	-	+	NT	+++
15°C – 5 dan	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+++	NT	+++
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-

**Legenda:** Rast na različnih gojiščih C1 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; H1 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; C2 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarozo kot sredstvom za trdno gojišče; H2 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarozo kot sredstvom za trdno gojišče. Rast na C1, C2, H1, H2; rast pri 7°C/15°C +++ najboljša rast, ++ srednja rast, + slabša rast, - ni rasti. Rast pri 30°C, 37°C + rast, - ni rasti . Hem – rast na krvnem agarju: +++ močnejša hemoliza, + hemoliza. NT – ni testirano. Vp - “velik” plazmid, Mvp - “majhen” in “velik” plazmid. Oklepaji pomenijo nekoliko slabšo rast kot jo nakazujejo znaki v oklepaju.

Izmed šestnajstih izoliranih sevov iz rodu *Shewanella* jih je bilo štirinajst med seboj različnih. Seve S1-S7 smo določili s pomočjo sekvenc delov genov za 16S rRNA, seve S8-S14 pa na podlagi morfološke podobnosti z identificiranimi sevi in barvanjem po Gramu. Diverziteta znotraj tega rodu je bila dokaj velika.

Hemoliza se pri testiranih sevih iz rodu *Shewanella*, razen pri enem izolatu, ni pojavila. Od šestih sevov iz tega rodu pri katerih smo preverjali rast na gojiščih z agarjem kot sredstvom za trdna gojišča in hitinom ali karboksimetil celulozo kot edinim virom ogljika, jih je raslo pet. Od teh sevov dva seva nista zrasla na gojiščih z agarozo kot sredstvom za trdna gojišča in karboksimetilcelulozo kot virom ogljika, pri enem pa rasti na teh gojiščih nismo preverjali. Večinoma pa so sevi rasli na obeh gojiščih s temo dvema viroma ogljika.

Pri temperaturi 7°C je po enem dnevu zraslo 42 % različnih sevov tega rodu, katerih rast je bila slaba. Po petih dneh so zrasli vsi sevi, pri dveh sevih pa je bila rast še vedno slaba. Pri temperaturi 15°C je zraslo po enem dnevu 62 % sevov, po petih pa vsi, rast večine pa je bila dobra. Vsi sevi tega rodu so rasli pri temperaturi 30°C, pri 37°C pa 43 % sevov tega rodu.

**Preglednica 10.** Rast izoliranih sevov iz rodu *Serratia* na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.

	Sr1	Sr2	Sr3	Sr4	Sr5	Sr6
<i>Hem</i>	-	-	-	-	-	+
<i>H1</i>	NT	NT	+	NT	NT	NT
<i>CMC1</i>	NT	NT	+	NT	NT	NT
<i>H2</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>CMC2</i>	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>7°C – 1 dan</i>	++	++	++	++	(+)	(+)
<i>7°C – 5 dan</i>	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>15°C – 1 dan</i>	++	++	++	+++	+++	++
<i>15°C – 5 dan</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++
<i>30°C</i>	+	+	+	+	+	+
<i>37°C</i>	+	+	+	+	+	+

**Legenda:** *Rast na različnih gojiščih* C1 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; H1 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; C2 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarozu kot sredstvom za trdno gojišče; H2 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarozu kot sredstvom za trdno gojišče. *Rast na C1, C2, H1, H2; rast pri 7°C/15°C* +++ najboljša rast, ++ srednja rast, + slabša rast, - ni rasti. *Rast pri 30°C, 37°C* + rast, - ni rasti . *Hem* – rast na krvnem agarju: +++ močnejša hemoliza, + hemoliza. NT – ni testirano. Oklepaji pomenijo nekoliko slabšo rast kot jo nakazujejo znaki v oklepaju.

Izolirali smo devet sevov iz rodu *Serratia*, šest od teh pa se je med seboj razlikovalo. Seve Sr1-Sr5 smo določili s pomočjo sekvenc genov za 16S rRNA, sev Sr6 pa na podlagi morfološke podobnosti z določenimi sevi in barvanjem po Gramu. Sevi tega rodu so bili med seboj bolj podobni, diverziteta, ugotovljena na podlagi testiranih lastnosti, ni bila tako velika.

Pri testiranih sevih iz rodu *Serratia* razen pri sevu Sr6 nismo zasledili hemolitične aktivnosti. Rast na gojiščih z agarjem kot sredstvom za trdna gojišča in karboksimetil celulozo ali hitinom kot virom ogljika smo preverili le za en sev, ki je na obeh gojiščih zrasel. Pri temperaturi 7°C so po enem dnevu zrasli vsi sevi tega rodu, slabša rast se je pojavila pri dveh sevih. Vsi sevi so dobro zrasli po petih dneh inkubacije. Podobni rezultati so bili tudi pri temperaturi 15°C. Vsi sevi so rasli pri temperaturah 30°C in 37°C.

**Preglednica 11.** Rast izoliranih sevov iz rodu *Bacillus* skupine d na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.

	Bd1	Bd2	Bd3
<i>Hem</i>	-	+	+
<i>H1</i>	NT	NT	NT
<i>CMC1</i>	NT	NT	NT
<i>H2</i>	NT	NT	NT
<i>CMC2</i>	NT	NT	NT
<i>7°C – 1 dan</i>	-	(+)	-
<i>7°C – 5 dan</i>	++	++	+
<i>15°C – 1 dan</i>	-	+	++
<i>15°C – 5 dan</i>	+++	+++	+++
<i>30°C</i>	+	+	+
<i>37°C</i>	+	+	+

**Legenda:** Rast na različnih gojiščih C1 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; H1 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; C2 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarozo kot sredstvom za trdno gojišče; H2 - minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarozo kot sredstvom za trdno gojišče. Rast na C1, C2, H1, H2; rast pri 7°C/15°C +++ najboljša rast, ++ srednja rast , + slabša rast, - ni rasti. Rast pri 30°C, 37°C + rast, - ni rasti . Hem – rast na krvnem agarju: +++ močnejša hemoliza, + hemoliza. NT – ni testirano. Oklepaji pomenijo nekoliko slabšo rast kot jo nakazujejo znaki v oklepaju.

Izmed štirih izoliranih sevov iz rodu *Bacillus* skupine d so bili trije med seboj različni. Seva Bd1 in Bd2 smo določili s pomočjo sekvenc genov za 16S rRNA, sev Bd3 pa na podlagi morfološke podobnosti z identificiranimi sevoma in barvanjem po Gramu.

Razen seva Bd1 smo pri ostalih sevih iz tega rodu zasledili hemolitično aktivnost. Rasti na gojiščih z karboksimetil celulozo ali hitinom pri teh sevih nismo preverjali. Pri temperaturi 7°C je po enem dnevu zrasel le en sev tega rodu in še rast tega je bila slaba. Po petih dneh so zrasli vsi sevi. Pri temperaturi 15°C po enem dnevu ni zrasel en sev, po petih pa vsi, njihova rast pa je bila dobra. Vsi sevi tega rodu so rasli pri 30°C in 37°C.

**Preglednica 12.** Rast izoliranih sevov iz ostalih rodov na različnih gojiščih in pri različnih temperaturah.

	Pa	St	Ac <i>mvp</i>	Ba	Al1 <i>vp</i>	Oe <i>vp</i>	Ah	Oh
<i>Hem</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>H1</i>	+	-	+	NT	NT	+++	++	NT
<i>CMC1</i>	(+)	-	++	NT	NT	+++	++	NT
<i>H2</i>	-	NT	+	NT	NT	++	NT	NT
<i>CMC2</i>	-	NT	(+)	NT	NT	+	NT	NT
7°C – 1 dan	-	-	+	-	-	-	-	-
7°C – 5 dan	-	+++	+	(+)	(+)	-	+	+
15°C – 1 dan	-	-	+	-	-	-	-	-
15°C – 5 dan	+	++	++	++	++	++	++	++
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+

**Legenda:** Pa – *Paenibacillus*, St – *Staphylococcus*, Ac – *Acinetobacter*, Ba – *Bacillus* sk. a, Al – *Alcaligenes*, Oe – *Oerskovia*, Ah – *Achromobacter*, Oh – *Ochrobacter*. Rast na različnih gojiščih: C1 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; H1 – minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarjem kot sredstvom za trdno gojišče; C2 – minimalno gojišče z celulozo kot edinim virom ogljika in agarozo kot sredstvom za trdno gojišče; H2 – minimalno gojišče z hitinom kot edinim virom ogljika in agarozo kot sredstvom za trdno gojišče. Rast na C1, C2, H1, H2; rast pri 7°C/15°C: +++ najboljša rast, ++ srednja rast, + slabša rast, - ni rasti. Rast pri 30°C, 37°C: + rast, - ni rasti. Hem – rast na krvnem agarju: +++ močnejša hemoliza, + hemoliza. NT – ni testirano. Vp – “velik” plazmid, Mvp – “majhen” in “velik” plazmid. Oklepaji pomenijo nekoliko slabšo rast kot jo nakazujejo znaki v oklepaju.

Pri sevih ostalih rodov primerjave med različnimi izolati ne moremo podati, saj smo fenotipske lastnosti preverjali le za en sev posameznega rodu. Ti sevi so bili na prvotnih ploščah manj pogosti oz. so se pojavljale le posamezne kolonije. Za vsak rod sta bila iz različnih predelov prebavil izolirana po največ dva izolata.

#### 4.3.2 Odpornost proti protimikrobnim učinkovinam

Z ugotavljanjem odpornosti proti različnim protimikrobnim učinkovinam smo skušali razlikovati med sevi in določiti njihovo pestrost znotraj rodov.

**Preglednica 13.** Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu *Aeromonas*.

skupina	protimik. učink.	A1 vp	A2 vp	A3 vp	A4 vp	A5 vp	A6 vp	A7 vp	A8 vp	A9 vp	A10 vp	A11	A12	A13	A14	A15	A16
<i>penicilini</i>	AM	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>cefalosporini</i>	CTX	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	CXM	S	S	S	R	S	S	S	R	S	I	I	S	R	S	R	S
<i>karbapenemi</i>	IPM	S	S	R*	R*	S	R*	I*	S	I	S	S	S	S	R	S	S
<i>aminoglikozidi</i>	GM	S	S	S	R	S	S	I	I	I	I	I	I	R	S	R	S
	K	NT	S	NT	S	S	S	S	S								
	S	R	I	R	R	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I
<i>makrolidi</i>	AZM	R	I	I	R	I	S	R	I	I	R	S	I	R	R	R	R
	E	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>tetraciklini</i>	TC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>kinoloni</i>	CIP	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
	NK	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>ostali</i>	C	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
	TMP	S*	S	I	R	S*	S	R	S	S	S*	R	S	R	I*	I	S

**Legenda:** TC - tetraciklin, CIP - ciprofloksacin, AM - ampicilin, E - eritromicin, S - streptomycin, IPM - imipenem, AZM - azitromicilin, CXM - cefuroksim, GM - gentamicin, C - kloramfenikol, TMP - trimetoprim; R - sev odporen proti protimikrobnim učinkovinam, R\* - slabša rast v okolici diska, I - intermediarna, vmesna občutljivost; I\* - slabša rast; S - sev občutljiv za protimikroben učinkovino ; S\* - malo raste v okolici diska; NT - ni bilo testirano; CTX - osnovno gojišče LB z cefotaksimom (koncentracija 6 µg/ml); NK - osnovno gojišče LB z nalidiksično kislino (25 µg/ml); + rast, - ni rasti; Vp - "velik" plazmid, Mvp - "majhen" in "velik" plazmid.

Testirani sevi iz rodu *Aeromonas* so bili odporni proti eritromicinu (100 %), ampicilinu (88%), streptomicinu (75 %), azitromicinu (50 %) in cefotaksimu (50 %). Občutljivi pa so bili za tetraciklin (100 %), kloramfenikol (88 %), ciprofloksacin (81 %), nalidiksično kislino (81%), trimetoprim (69 %), cefuroksim (63 %), imipenem (63 %) in gentamicin (38 %).

Proti eni sami protimikrobnim učinkovini ni bil odporen nobeden od obravnavanih sevov tega rodu, proti dvema protimikrobnima učinkovinama eden, proti več kot dvema pa preostalih 15 sevov tega rodu. Največ izolatov je bilo odpornih proti 4 protimikrobnim učinkovinam (38 %). Sev A4 pa je bil odporen celo proti 10 protimikrobnim učinkovinam hkrati.



**Slika 8.** Primer odpornosti proti ampicilinu (levo), intermediarne odpornosti proti ciprofloksacinu (zgoraj) ter občutljivosti za tetraciklin (desno) pri sevu A4 iz rodu *Aeromons* - difuzijska metoda z diskami.

Pri rodu *Aeromonas* smo našli le »velike« plazmide, večje od 20kb. Pojavljali so se pri sevih, ki so bili odporni proti različnim številom protimikrobnih učinkovin, od dve do deset. Prisotnost plazmidov smo preverjali le pri dvanajstih sevih iz tega rodu.

**Preglednica 14.** Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu *Shewanella*.

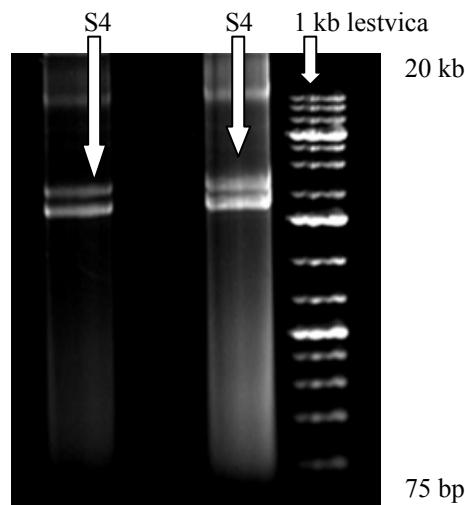
skupina	protimik. učink.	S1 <i>mvp</i>	S2 <i>vp</i>	S3 <i>mvp</i>	S4 <i>vp</i>	S5 <i>mvp</i>	S6 <i>vp</i>	S7 <i>vp</i>	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14
<i>penicilini</i>	AM	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S*	R
<i>cefalosporini</i>	CTX	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	(+)	+	+	-
	CXM	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	I	S	S	R
<i>karbapenemi</i>	IPM	S	R	S	R*	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S*
<i>aminoglikozidi</i>	GM	I	S	R	I	S	I	S	I*	R	S	S	I	S	R
	K	NT	S	S	S	NT	NT	NT	NT	NT	NT	S	S	NT	NT
	S	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	R
<i>makrolidi</i>	AZM	R	S	R	I	I	S	S	R	R	R	S	I	S	R
	E	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>tetraciklini</i>	TC	I	S	S	I	S	S	S	R	R	I	S	S	S	R
<i>kinoloni</i>	CIP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	NK	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>ostali</i>	C	I	S	I	S	S	S	I	S	R	I	I	S	S	R
	TMP	S*	S	S	S*	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R

**Legenda:** TC - tetraciklin, CIP - ciprofloxacin, AM - ampicilin, E - eritromicin, S - streptomicin, IPM - imipenem, AZM - azitromicilin, CXM - cefuroksim, GM - gentamicin, C - kloramfenikol, TMP - trimetoprim; R - sev odporen proti protimikrobni učinkovini, R\* - slabša rast v okolici diska, I - intermediarna, vmesna občutljivost; I\* - slabša rast v okolici diska; S - sev občutljiv za protimikrobeno učinkovino ; S\* - malo raste v okolici diska; NT - ni bilo testirano; CTX - osnovno gojišče LB z cefotaksimom (koncentracija 6 µg/ml); NK - osnovno gojišče LB z nalidiksično kislino (25 µg/ml); + rast, - ni rasti; Vp - "velik" plazmid, Mvp - "majhen" in "velik" plazmid. Oklepaji pomenijo nekoliko slabšo rast kot jo nakazujejo znaki v oklepaju.

Testirani sevi iz rodu *Shewanella* so bili odporni proti ampicilinu (86 %), eritromicinu (100%), streptomicinu (71 %), cefuroksimu (50 %), cefotaksimu (64 %) in azitromicinu (43%). Občutljivi pa so bili za ciprofloksacin (100 %), imipenem (79 %), trimetoprim (71 %), tetraciklin (57 %), kloramfenikol (50 %) in gentamicin (43 %).

Proti eni protimikrobnim učinkovini ni bil odporen nobeden od obravnavanih sevov tega rodu, proti dvema protimikrobnima učinkovinama dva, proti več kot dvema pa preostalih 13 sevov tega rodu. Največ izolatov je bilo odpornih proti šestim protimikrobnim učinkovinam (21 %). Sev S9 pa je bil odporen celo proti 11 protimikrobnim učinkovinam hkrati.

Pri rodu *Shewanella* smo našli poleg »velikih« tudi »majhne« plazmide, velike 1500 bp do 2500 bp. Pojavljajo se pri sevih, kjer smo zasledili od 2-6 determinant odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam. Prisotnost plazmidov smo preverjali le pri šestih sevih iz tega rodu.



Slika 9. Dva »majhna« plazmida izolirana iz seva S4 iz rodu *Shewanella*.

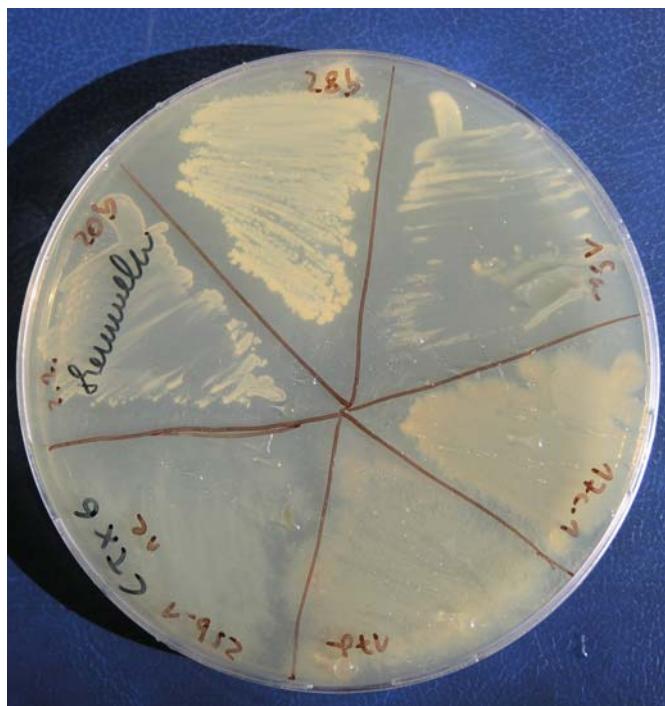
**Preglednica 15.** Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu *Serratia*.

skupina	protimik. učink.	Sr1	Sr2	Sr3	Sr4	Sr5	Sr6
<i>penicilini</i>	AM	R	R	R	S	R	R
<i>cefalosporini</i>	CTX	+	-	-	-	-	-
	CXM	R	R	R	R	R	R
<i>karbapenemi</i>	IPM	S	S	S	S	S	S
<i>aminoglikozidi</i>	GM	I	S	S	I	I	R
	K	S	NT	NT	NT	NT	NT
	S	R	I	I	R	R	R
<i>makrolidi</i>	AZM	R	R	I	R	R	I
	E	R	R	R	R	R	R
<i>tetraciklini</i>	TC	I	I	I	I	R	R
<i>kinoloni</i>	CIP	S	S	S	R	S	S
	NK	-	-	-	-	-	-
<i>ostali</i>	C	I	S	I	S	I	S
	TMP	S	R	S	S	S	S

**Legenda:** TC - tetraciklin, CIP - ciprofloxacin, AM - ampicilin, E - eritromicin, S - streptomycin, IPM - imipenem, AZM - azitromicin, CXM - cefuroksim, GM - gentamicin, C - kloramfenikol, TMP - trimetoprim; R - sev odporen proti protimikrobnim učinkovinam, R\* - slabša rast v okolici diska, I - intermediarna, vmesna občutljivost; I\* - slabša rast v okolici diska; S - sev občutljiv za protimikrobno učinkovino ; S\* - malo raste v okolici diska; NT - ni bilo testirano; CTX - osnovno gojišče LB z cefotaksimom (koncentracija 6 µg/ml); NK - osnovno gojišče LB z nalidiksično kislino (25 µg/ml); + rast, - ni rasti.

Testirani sevi iz rodu *Serratia* so bili odporni proti cefuroksimu (100 %), eritromicinu (100%), ampicilinu (83 %), streptomycinu (67 %), cefotaksimu (83 %), azitromicinu (67 %) in tetraciklinu (33 %). Občutljivi pa so bili za imipenem (100 %), nalidiksično kislino (100 %), ciprofloxacin (83 %), trimetoprim (83 %), kloramfenikol (50 %) in gentamicin (33 %).

Proti eni ali dvema protimikrobnima učinkovinama ni bil odporen nobeden od testiranih sevov tega rodu, vseh 6 sevov je bilo odpornih proti več kot dvema. Največ izolatov je bilo odpornih proti 6 protimikrobnim učinkovinam (50 %), kar je hkrati tudi največje število protimikrobnih učinkovin na katere so bili odporni sevi tega rodu.



**Slika 10.** Primer odpornosti proti cefotaksimu pri sevu Sr5 (28b) iz rodu *Serratia*- rast seva na gojišču LB z dodanim cefotaksimom.

Pri dveh sevih iz tega rodu smo preverjali prisotnost plazmidov in le-teh nismo našli.

**Preglednica 16.** Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz rodu *Bacillus* skupine d.

skupina	protimik. učink.	Bd1	Bd2	Bd3
<i>penicilini</i>	AM	R	R	R
<i>cefalosporini</i>	CTX	+	+	+
	CXM	R	R	R
<i>karbapenemi</i>	IPM	S	S	S
<i>aminoglikozidi</i>	GM	S	S	I
	K	S	NT	NT
	S	I	I	S
<i>makrolidi</i>	AZM	S	S	S
	E	I	I	I
<i>tetraciklini</i>	TC	S	S	R
<i>kinoloni</i>	CIP	S	S	S
	NK	-	-	-
<i>ostali</i>	C	S	S	S
	TMP	R	R	R

**Legenda:** TC - tetraciklin, CIP - ciprofloksacin, AM - ampicilin, E - eritromicin, S - streptomycin, IPM - imipenem, AZM - azitromicilin, CXM - cefuroksim, GM - gentamicin, C - kloramfenikol, TMP - trimetoprim; R - sev odporen proti protimikrobnim učinkovinam, R\* - slabša rast v okolici diska, I - intermediarna, vmesna občutljivost; I\* - slabša rast v okolici diska; S - sev občutljiv za protimikrobeno učinkovino ; S\* - malo raste v okolici diska; NT - ni bilo testirano; CTX - osnovno gojišče LB z cefotaksimom (koncentracija 6 µg/ml); NK - osnovno gojišče LB z nalidiksično kislino (25 µg/ml); + rast, - ni rasti.

Obravnavani sevi iz rodu *Bacillus* skupine d so bili odporni proti cefuroksimu (100 %), ampicilinu (100 %), trimetoprimu (100 %) in cefotaksimu (100 %). Občutljivi pa so bili za imipenem (100 %), nalidiksično kislino (100 %), azitromicin (100 %), kloramfenikol (100%), ciprofloksacin (83 %), gentamicin (67 %), tetraciklin (67 %) in streptomycin (33 %). Na eritromicin niso bili ne odporni in ne občutljivi, saj je bila pri vseh sevih odpornost vmesna – intermediarna.

Proti eni ali dvema protimikrobnima učinkovinama ni bil odporen nobeden od testiranih sevov tega rodu, vsi trije sevi so odporni proti več kot dvema protimikrobnima učinkovinama. Največ izolatov iz rodu *Bacillus* skupine d je bilo odpornih proti 4 protimikrobnim učinkovinam (67 %), sev Bd3 pa je bil odporen kar proti petim protimikrobnim učinkovinam.

Prisotnosti plazmidov nismo preverjali.

**Preglednica 17.** Odpornost proti različnim protimikrobnim učinkovinam izoliranih sevov iz ostalih rodov.

skupina	protimik. učink.	Pa	St	Ac <i>mvp</i>	Ba	Al1 <i>vp</i>	Oe <i>vp</i>	Ah	Oh
<i>penicilini</i>	AM	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>cefalosporini</i>	CTX	-	-	+	+	-	+	+	+
	CXM	R	S	I	R	R	I	R	R
<i>karbapenemi</i>	GM	S	S	S	S	R	R	R	R
<i>aminoglikozidi</i>	K	S	S	S	S	S	I	S	S
	S	S	R	S	I	R	R	R	R
	IPM	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>makrolidi</i>	AZM	R	I	R	S	R	R	R	R
	E	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>tetraciklini</i>	TC	S	S	I	S	S	R	S	S
<i>kinoloni</i>	CIP	I	S	S	S	I	R	R	I
	NK	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>ostali</i>	C	S	S	S	S	I	S	I	I
	TMP	R	S	R	S	R	R	R	R

**Legenda:** Pa – *Paenibacillus*, St – *Staphylococcus*, Ac – *Acinetobacter*, Ba – *Bacillus* sk. a, Al – *Alcaligenes*, Oe – *Oerskovia*, Ah – *Achromobacter*, Oh – *Ochrobacter*. TC - tetraciklin, CIP - ciprofloksacin, AM - ampicilin, E - eritromicin, S - streptomicin, IPM - imipenem, AZM - azitromicilin, CXM - cefuroksim, GM - gentamicin, C - kloramfenikol, TMP - trimetoprim; R - sev odporen proti protimikrobnim učinkovinam, R\* - slabša rast v okolici diska, I - intermediarna, vmesna občutljivost; I\* - slabša rast v okolici diska; S - sev občutljiv za protimikrobeno učinkovino ; S\* - malo raste v okolici diska; NT - ni bilo testirano; CTX - osnovno gojišče LB z cefotaksimom (koncentracija 6 µg/ml); NK - osnovno gojišče LB z nalidiksično kislino (25 µg/ml); + rast, - ni rasti; Vp - "velik" plazmid, Mvp - "majhen" in "velik" plazmid.

Pri sevih ostalih rodov odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam nismo mogli primerjati, saj smo le-te preverjali le za en sev posameznega rodu. Glede odpornosti proti velikemu številu protimikrobnih učinkovin je potrebno omeniti sev iz rodu *Oerskovia*. O tem rodu je v literaturi le malo podatkov. Odpornosti proti večjemu številu protimikrobnih učinkovin smo zasledili pri izolatih iz rodov *Achromobacter* in *Ochrobacter*.

#### 4.4 PRISOTNOST PLAZMIDOV V IZOLIRANIH SEVIH

Plazmide, prisotne pri izoliranih sevih, smo razdelili v dve skupini. Med »velike« plazmide smo uvrstili plazmide katerih CCC oblika je potovala pod zadnjim fragmentom 1 kb lestvice (večji od 20 kb), med »majhne« plazmide pa smo uvrstili plazmide katerih CCC oblike so potovale s fragmenti linearne 1 kb lestvice. »Majhni« plazmidi najdeni pri rodu *Shewanella* so bili veliki od 1500 bp do 2500 bp, pri rodu *Acinetobacter* pa se je pojavilo več majhnih plazmidov različnih velikosti. Tekom nadaljnega dela smo se osredotočili na »majhne« plazmide, katerih zgradbo - zaporedje nukleotidov bi lažje določili. Z restrikcijo teh plazmidov z različnimi encimi smo najprej skušali najti encim, ki bi plazmid rezal le enkrat. Tako bi dobili linearen fragment, ki bi ga lahko vstavili v vektor pUC19.

Prisotnost velikih plazmidov:

- sevi S2, S3, S4, S5, S7 in S14 iz rodu *Shewanella*
- sevi A1, A2, A4, A5, A7, A10, A14, A15, A18 iz rodu *Aeromonas*
- sev A11 iz rodu *Alcaligenes*
- sev Oe iz rodu *Oerskovia*
- sev Ac iz rodu *Acinetobacter*

Prisotnost majhnih plazmidov:

- seva S2 in S4 iz rodu *Shewanella*
- sev Ac iz rodu *Acinetobacter*

Prisotnost plazmidov je prikazana tudi v preglednicah 9-11 in 16-17.

#### 4.5 KLONIRANJE

Poskus kloniranja »majhnih« plazmidov (fragmentov njihove DNA) nam ni uspel, saj smo pri elektroforezi rekombinantne plazmidne DNA dobili le produkte velikosti plazmida pUC19 (nad 1,5 kb), v katerega naj bi vstavili fragment izolirane plazmidne DNA. Pri agarozni gelski elektroforezi smo pri nekaterih vzorcih opazili še dva fragmenta. Glede na velikost enega fragmenta smo predvidevali, da gre za genomsko DNA. Glede na velikost drugega, ki se je pojavil na začetku lestvice (manjši od 75 bp), pa smo predvidevali, da gre za RNA.

Z restrikcijo rekombinantne plazmidne DNA smo neuspešnost kloniranja le še potrdili, saj je bil po elektroforezi viden le en fragment v velikosti razrezanega plazmida pUC19 (fragment je bil nekoliko večji od 2,5 kb; velikost razrezanega plazmida pUC19 je 2696 bp), ki je služil kot vektor za prenos linearnega plazmida iz izoliranega seva v recipientski sev *E.coli*.

S kloniranjem delov plazmidov po enem neuspelem poizkusu nismo nadaljevali.

#### 4.6 KONJUGACIJA

S konjugacijo smo preverili možnost prenosa plazmidov iz izoliranih sevov (donorjev) v definiran sev bakterije *E.coli* (recipient). Za donorje smo uporabili seve, pri katerih smo našli plazmide. Transkonjugant, kljub večkratnemu poskušanju razmazovanja konjugacijske mešanice na različna selekcijska gojišča, nismo izsledili.

#### 4.7 IDENTIFIKACIJA ESBL (BETA-LAKTAMAZE Z RAZŠIRJENIM SPEKTROM DELOVANJA) PRODUCIRajočIH SEVOV

Pri pomnoževanju z različnimi primerji smo preverjali prisotnost delov določenih genov le za seve, ki so rasli na gojiščih z cefotaksimom (CT) s koncentracijo 6 µg/ml.

##### 4.7.1 Identifikacija ESBL producirajočih sevov z difuzijsko metodo z diskami in Etestom

Z difuzijsko metodo z diskami smo določili posamezne seve, ki bi lahko potencialno izločali ESBL (A7, A14, A10, S1, S2, S12, Sr1, Ac), kar smo skušali še dodatno preveriti s pomočjo E testa (CT/CTL). Ugotovili smo, da izolat Ac iz rodu *Acinetobacter* verjetno izloča ESBL, saj je bila cona inhibicije ob prisotnosti klavulanske kislinske nekoliko večja kot pri samem cefotaksimu. Prav tako smo ugotovili, da je sev S2 iz rodu *Shewanella*, sicer občutljiv za delovanje cefotaksima, ob dodatku klavulanske kislinske postane odporen, kar bi lahko pomenilo prisotnost t.i. AmpC beta-laktamaz, ki jih klavulanska kislina pogosto inducira.



**Slika 11.** Primer E testa, s katerim smo ugotavljali MIC za cefotaksim (CT) in cefotaksim z klavulansko kislino (CTL), pri sevu S2 iz rodu *Shewanella*.

#### 4.7.2 Pomnoževanje delov genov z začetnimi oligonukleotidi panCTX, TEM, SHV in DHA

Ustrezno velike produkte smo dobili pri dveh sevih rodu *Shewanella*, pri sevu S1 z začetnim oligonukleotidom panCTX in pri sevu S12 z začetnim oligonukleotidom SHV. Prav tako smo dobili ustrezno velik produkt pri sevu A14, ki je bil morfološko določen za rod *Aeromonas*, z začetnim oligonukleotidom panCTX. Izrez iz gela in čiščenje teh produktov ni bilo uspešno, saj smo imeli pri tem velike izgube. Kljub temu smo nekatere fragmente poslali sekvencirati, med njimi tudi nespecifičen produkt z začetnim oligonukleotidom SHV pri sevu S12, ki je bil morfološko določen za rod *Shewanella*. Koncentracija očiščenih fragmentov je bila premajhna, zato določanje nukleotidnega zaporedja pri sevih A14 iz rodu *Aeromonas* ter S2 in S12 iz rodu *Shewanella* ni uspelo.

### 4.8 IDENTIFIKACIJA SEVOV S PLAZMIDNO KODIRANO ODPORNOSTJO PROTI KINOLONOM-PMQR

#### 4.8.1 Ugotavljanje prisotnosti delov genov *qnr*

Pri vseh sevih smo v multipleks PCR reakciji z štirimi pari začetnih oligonukleotidov (QnrAm-F/QnrAm-R, QnrBm-F/ QnrBm-R, QnrC F/QnrC R, QnrSm-F/ QnrSm-R) pomnožili dele genov *qnrA*, *qnrB*, *qnrC* in *qnrS*. Zapisa za gen *qnrA* nismo našli, zato smo

PCR s posameznimi začetnimi oligonukleotidi ponovili le za preostale tri pare oligonukleotidov.

Ko smo z elektroforezo analizirali PCR pomnožke, smo pri nekaterih sevih zasledili fragmente z ustrezno velikostjo. Da bi preverili ali gre za specifične produkte, smo pomnožke izrezali iz gela, očistili in sekvencirali. Po analizi nukleotidnega zaporedja smo ugotovili, da je šlo za nespecifične pomnožke, ki niso bili podobni iskanim genom.

Ustreznost pomnoženih delov genov *qnrB* smo nadaljne preverili z restrikcijo z encimom, ki po analizi zaporedja *qnrB* v podatkovnih bazah, cepi pomnožen gen. Ker našega PCR pomnožka s tem encimom nismo uspeli razrezati, smo sklepali, da gre tudi v tem primeru za nespecifičen produkt.

#### **4.8.2 Ugotavljanje prisotnosti delov genov *aac(6')-Ib* in *aac(6')-Ib-cr***

Pri nobenem sevu s parom začetnih oligonukleotidov *qac1/qac2* nismo pomnožili dela gena za encim aminoglikozid acetiltransferazo, saj nismo dobili ustrezno velikih produktov. Ta naj bi bil veliki 514 bp, pri naših izoliranih sevih pa so bili pomnožki večji od 600 bp.

#### **4.9 E TESTI ZA MOKSIFLOKSACIN**

Rezultati E testov za moksifloksacin so podani v prilogi, saj v literaturi nismo zasledili enotne interpretacije rezultatov E testov za to protimikrobnoučinkovino pri testiranih rodovih. Na tem področju obstaja možnost nadaljnega raziskovanja.

#### **4.10 UGOTAVLJANJE POVZROČITELJEV ZAVIRANJA RASTI IZOLIRANEGA SEVA IZ RODU *BACILLUS* SKUPINE D**

Na prvotnih ploščah smo opazili, da je ena od bakterij vplivala na rast seva Bd1 iz rodu *Bacillus* skupine d. Na plošči so bili prisotni sevi A7 iz rodu *Aeromonas*, S9 in S11 iz rodu *Shewanella* ter Ac iz rodu *Acinetobacter*. Z razmazovanjem vseh na prvotni plošči prisotnih sevov na isto ploščo smo ugotovili, da rast seva Bd1 iz rodu *Bacillus* skupine d zavira sev S11 iz rodu *Shewanella*.

#### **4.11 UGOTAVLJANJE PROTIGLIVNEGA DELOVANJA**

Na prvotni plošči z izolati iz ust je ena izmed bakterij vplivala na rast prisotne nedefinirane glive. Ugotovili smo, da je sev, ki zavira rast nedefinirane glive, pripadal rodu *Alcaligenes*.



**Slika 12.** Primer protiglavnega delovanja. Na sredini plošče je razmazana gliva, prečno 3-4 mm od le-te protirobu plošče pa posamezni sevi z prvotne plošče— Al2 (29a.1) in Bd1 (29a.2).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomske naloge smo opravili pilotno raziskavo pestrosti mikrobiote v prebavilih močerila, saj le-ta do sedaj še ni bila poznana. Pri raziskavi smo si pomagali s skromni podatki o mikrobioti v prebavilih ožje sorodnih organizmov, kot so žabe, kjer so na voljo podatki starejših raziskav (Gossling in sod., 1982 a in b; Hird in sod., 1983) ter tudi z raziskavami mikrobiote v prebavilih rib, ki so sicer manj sorodne močerilu, a so kljub temu vodni, ektotermni organizmi, katerih mikrobiota je precej dobro raziskana (Macfarlane in sod., 1986; Holben in sod., 2002; Hubert in sod., 2004; Rawls in sod., 2004; Al-Harabi in Uddin 2005; Bates in sod., 2006).

Skušali smo ugotoviti, kako pogoji v prebavilih vplivajo na poselitev z bakterijami in njihovo diverziteto. Pri tem smo se oprli na raziskave pri prebavilih človeka (Brock in sod., 1994), kot predstavnika vretenčarjev kamor spada tudi močeril, saj za močerila in ožje sorodnike ni podatkov o pogojih znotraj prebavil, razen tega, da so v želodcu prisotne celice podobne tistim, ki naj bi izločale HCl (Bizjak-Mali, 1995), ki zniža pH v tem predelu prebavil. V raziskavah prebavil rib so ugotovili, da v njih vladajo pogoji, kot so nizek pH, pomanjkanje kisika in obilna količina nutrientov (Hubert in sod., 2004).

Pri raziskavah smo uporabili relativno enostavna gojišča zaradi lažje obvladljivosti in omejenosti raziskav v okviru diplomske naloge. Na tradicionalnih substratih z agarjem lahko gojimo le del celotnega števila bakterij prisotnih v vzorcu, gojitveno-pogojena identifikacija pa je lahko zaradi selektivnosti gojišča pristranska (Hubert in sod., 2004; Rawls in sod., 2004). Vseeno pa dominanten del mikroflore, ki smo ga izolirali, gojili in identificirali, verjetno igra pomembno vlogo tudi *in vivo* (Hubert in sod., 2004).

Skupaj smo identificirali dvanajst različnih rodov. Pri raziskavah mikrobiote v prebavilih rib so našli od deset do šestnajst različnih rodov, odvisno od vrste posameznih rib (Al-Harbi in Uddin, 2005; Holben in sod., 2002; Huber in sod., 2004; Macfarlane in sod., 1986). Pri raziskavah mikrobiote žab so bile večinoma identificirane le širše skupine bakterij, glede na to, katere substrate so razgrajevale (Gossling in sod., 1982 a in b). Pri eni raziskavi pa so identificirali dvanajst različnih rodov (Hird in sod., 1983).

Na prvotnih ploščah so bili prevladujoči sevi iz rodov *Shewanella* in *Aeromonas*. Tudi Al-Harbi in Uddini (2005) sta pri raziskavah mikrobiote prebavil rib določila kot najpogostejše predstavnike iz rodu *Shewanella*. Ta rod so iz prebavil izolirali tudi Hubert in sodelavci (2004). Prav tako so bili v prebavilih rib prisotni predstavniki iz rodu *Aeromonas* (Hubert in sod., 2004; Al-Harabi in Uddin, 2005; MacFarlane in sod., 1986; Rawls in sod., 2004; Bates in sod., 2006). Rod *Aeromonas* so izolirali tudi iz prebavil žabe (Hird in sod., 1983).

Od preostalih rodov, ki smo jih izolirali iz prebavil močerila, so tudi iz prebavil rib izolirali predstavnike rodov *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Serratia* in *Staphylococcus* ( Hubert in sod., 2004; Holben in sod., 2002, MacFarlane in sod., 1986; Al-Harabi in Uddin, 2005), iz prebavil žab pa predstavnike rodu *Serratia* (Hird in sod., 1983).

Večina izoliranih bakterij je bila po Gramu negativnih. Tudi pri drugih raziskavah so poročali o prevladi po Gramu negativnih bakterij tako v prebavilih rib kot žab (Gossling in sod., 1982; Macfarlane in sod., 1986; Hubert in sod., 2004; Al-Harabi in Uddin 2005).

Največje število različnih izolatov posameznih rodov se je pojavilo v debelem črevesu. Prav tako je bila največa količina bakterij na prvotnih ploščah z izolati iz debelega črevesa (plošče so bile najbolj poraščene z bakterijami). Večinoma je šlo za monokulture bakterij iz rodov *Aeromonas* in *Shewanella*. Večje število bakterij se v debelem črevesu pojavlja tudi v prebavilih človeka, a so fakultativni aerobi prisotni v manjšem številu glede na druge bakterije (Brock in sod., 1994).

Na prvotnih ploščah z vzorci iz ust in požiralnika sta bila tako število bakterijskih kolonij kot njihova raznolikost manjša v primerjavi z kolonijami na prvotnih ploščah z izolati iz debelega črevesa. Podobno je bilo tudi v želodcu in dvanajsterniku. V ustih, požiralniku, želodcu in dvanajsterniku smo našli rodove, ki se v preostalih delih prebavilih niso pojavljali. To so bili *Achromobacter*, *Ochrobacter*, *Staphylococcus* in *Paenibacillus*. Tudi pri ljudeh je število bakterij v vsebini želodca ponavadi nizko, a je stena želodca običajno gosto poseljena z bakterijami. Na rast in pestrost bakterij vpliva predvsem nizek pH. Od dvanajsternika proti ileumu postaja pH postopno bolj bazičen, število bakterij pa se povečuje (Brock in sod., 1994).

### 5.1.1 Fenotipske lastnosti

#### 5.1.1.1 Hemolitična aktivnost

Hemolitično aktivnost so pri sevih iz rodu *Aeromonas* potrdili v več raziskavah, in sicer pri 48% do 100 % izolatov (Bondi in sod., 2000; Okitsu in sod., 2000; Wang in Silva, 1999; Năcescu in sod., 1992). Z dosedanjimi ugotovitvami se skladajo tudi naši rezultati, saj so bili testirani sevi iz tega rodu večinoma hemolitični (63 %).

Pri vrsti *Shewanella algae* poročajo o sintezi hemolitičnih substanc (Richards, 2008; Khashe in Janda, 1998), prav tako pri vrsti *S. baltica* (Richards in sod., 2008) in *S. affinis* (Ivanova in sod., 2004). Pri naših izolatih iz rodu *Shewanella* hemolize razen pri enem izolatu nismo ugotovili.

Obravnavani sevi rodu *Serratia* razen enega seva niso bili hemolitični. Za razliko od naših rezultatov so pri nekaterih vrstah rodu *Serratia* potrdili hemolitično aktivnost (Azambuja in sod., 2004; Braun in sod., 1985) in sintezo hemolizinov (Kim in sod., 2009; Hertle, 2005).

Obravnavani sevi rodu *Bacillus* skupine d so bili hemolitični z izjemo enega seva. Podobno kot pri naših ugotovitvah so hemolitično aktivnost zasledili pri vrstah *Bacillus subtilis* (Liu in sod., 2009; Ouoba in sod., 2008) in *B. cereus* (Ouoba in sod., 2008; Thaenthanee in sod., 2005; Beecher in Wong, 1997) iz tega rodu.

#### 5.1.1.2 Rast na gojiščih s hitinom ali karboksimetil celulozo

Celuloza in hitin lahko predstavlja dodaten vir ogljika in energije (Brock in sod., 1994). Izolirane bakterije iz prebavilnih močerila večinoma razgrajujojo hitin, dokazano pa je že bilo, da močeril poje največ rakov, poleti pa tudi insektov (Bulog in sod., 2000), katerih kutikula je zgrajena tudi iz hitina (Yang in sod., 2006). Tako mu bakterije verjetno lahko pomagajo pri razgradnji hrane.

Skoraj vsi obravnavani sevi rodu *Aeromonas* rastejo na gojiščih s karboksimetil celulozo in hitinom, pripravljenimi tako z agarjem kot agarozo. Ob dodatku agaroze kot sredstva za trdna gojišča so nekateri sevi iz tega rodu rasli nekoliko slabše, kar kaže na to, da so ti sevi na gojiščih z agarjem kot vir ogljika verjetno niso uporabljali samo hitina ali CMC, ampak nedefinirane primesi, ki so verjetno vsebovale organski ogljik. V literaturi so že večkrat

poročali o prisotnosti hitinaz pri sevih rodu *Aeromonas* (Liu in sod 2009; Kojima in sod, 2005; Lin in sod., 1997). Pri raziskavah Cantena in Calva (2001) so pri rodu *Aeromonas* našli številne encime, esteraze, esterazne lipaze in vrsto fosfohidrolaz, s pomočjo katerih naj bi ta rod sodeloval tudi pri razgradnji celuloze. Pri preučevanju hitinaze 92 iz vrste *Aeromonas hydrophila* pa so odkrili, da se le-ta veže tudi na celulozo (Chang in sod., 2004).

Tudi sevi iz rodu *Shewanella* so večinoma rasli na gojičih s hitinom. Podatki o hitinolitičnosti rodu *Shewanella* se razlikujejo v odvisnosti od vrste. Yang in sodelavci (2006) so skušali identificirati gene, ki sodelujejo pri metabolizmu hitina pri vrsti *Shewanella oneidensis*. Za vrsto *Shewanella affinis* pa so ugotovili, da ne razgrajuje hitina in škroba (Ivanova in sod., 2004). Pri rodu *Shewanella* v literaturi nismo zasledili podatkov o prisotnosti celulaz ali sposobnosti razgradnje celuloze. V okviru naših raziskav smo ugotovili, da je sposobnost razgradnje celuloze pri tem rodu nekoliko slabša (sevi slabše rastejo), sploh v kombinaciji le-te z agarozo, kar spet kaže na to, da bakterije na gojičih z agarjem kot vir ogljika verjetno niso uporabljale CMC. Samega agarja pa vrsta *Shewanella affinis* ne razgrajuje (Ivanova in sod., 2004).

Sposobnost razgradnje hitina in karboksimetil celuloze smo preverjali le pri enem sevu iz rodu *Serratia*. Ta je razgrajeval oba omenjena substrata, kar se ujema z rezultati preteklih raziskav, pri katerih so zasledili hitinaze (Zakariassen in sod., 2009; Synstad in sod., 2008; Makino in sod., 2007). Vrsta *Serratia marcescens* je sposobna počasne depolimerizacije karboksimetil celuloznih gelov (Thayer, 1978), precejšnjo celulazno aktivnost pa so pri rodu *Serratia* v svoji raziskavi opisali tudi Hameeda in sodelavci (2006).

#### 5.1.1.3 Rast pri različnih temperaturah

DNA smo izolirali iz sevov, ki so rasli pri različnih temperaturah, in pri tem skušali optimizirat samo izolacijo. Slabši izkoristek smo dobili pri izolaciji DNA iz sevov A6 in A9 iz rodu *Aeromonas*, ki so zrasli pri 37°C, kjer se je po agarozni gelski elektroforezi pojavil razmazan, nejasen fragment. Takšen fragment je verjetno posledica delovanja restriktivskih endonukleaz, saj nekateri od teh encimov bolje delujejo pri višjih temperaturah (37°C).

Zanimale so nas tudi možnost rasti in lastnosti naših sevov pri različnih temperaturah. S pomočjo tega smo posamezne seve med seboj razlikovali in ugotavliali možne vplive na rast teh sevov znotraj gostitelja kot je npr. vpliv temperature v njegovih prebavilih.

Najnižja temperatura pri katerih poročajo o rasti sevov iz rodu *Aeromonas* je 4°C (Gonzalez-Rodriguez in sod., 2004). Tudi pri nas je večina sevov iz rodu *Aeromonas* rasla pri najnižji testni temperaturi 7°C. Pri temperaturi 37°C je raslo 69 % različnih obravnavanih sevov iz rodu *Aeromonas*. Nekoliko višjo rast (92 %) so pri temperaturi 37°C zabeležili Statner in sodelavci (1988). Pri vmesnih temperaturah 15 in 30°C so zrasli vsi testirani sevi iz tega rodu.

Pri temperaturi 7, 15 in 30°C so zrasli vsi sevi iz rodu *Shewanella*, pri 37°C pa le 43 % izoliranih sevov tega rodu. Za različne vrste iz rodu *Shewanella* obstajajo v literaturi različni podatki o vplivih temperature na rast. Optimalna temperatura za rast seva iz rodu *Shewanella* naj bi bila 16,5°C, zaradi česar se sev uvršča med psihrofilne organizme (Irvin in sod., 2001). Vrsta *Shewanella oneidensis* je psihrotrofna (Tadokoro in sod, 2008), kar pomeni, da je sposobna preživet ali celo uspešno rast v hladnih okoljih ([http://en.wikipedia.org/wiki/Psychrotrophic\\_bacteria](http://en.wikipedia.org/wiki/Psychrotrophic_bacteria)). Vrsta *Shewanella affinis* pa je mezofilna (Ivanova in sod., 2004), kar pomeni, da najbolje raste pri temperaturah med 20°C in 45°C (Brock in sod., 1994).

Vsi sevi rodu *Serratia* so rasli pri vseh temperaturah, torej od 7°C do 37°C. Podatkov iz literature o temperturni odvisnosti rasti za ta rod nismo zasledili.

Vsi obravnavani sevi rodu *Bacillus* so rasli pri vseh testnih temperaturah, torej od 7°C do 37°C. Rod *Bacillus* je bil v nekaterih raziskavah določen za psihrotolerantga (Thorsen in sod., 2009; Huck, 2008), tudi vrsta *Bacillus weihenstephanensis* raste pri nižji temperaturi, in sicer pri 8°C (Thorsen in sod., 2009). Nekateri sevi iz rodu *Bacillus* pa so bili določeni za termofilne organizme (Rastogi in sod., 2009; Muhamed in sod., 2009; Brischoff in sod., 2006). Podobno je optimalna temperatura rasti vrste *Bacillus beveridgei* sp. nov. dokaj visoka, in sicer 40°C (Baesman, 2009). Nekateri bakterijski sevi iz rodu *Bacillus* tvorijo endospore ter tako preživijo visoke temperature (Huck in sod., 2008), pri višjih temperaturah pa delujejo tudi njihovi encimi (Shariff in sod., 2007).

Temperatura v prebavilih človeške ribice je verjetno glede na to, da gre za ektotermno žival odvisna od okoliških razmer, predvsem temperature, ki pa je v jamah dokaj nizka, v Planinski v povprečju 9°C (Sket in Velkovrh, 1981). Vsi našteti rodovi bi lahko glede na temperaturo rasli tako v prebavilih človeške ribice kot tudi v okoliški vodi. Seveda pa je sposobnost preživetja bakterije v prebavilih odvisna tudi od drugih pogojev, kot so nizek pH, pomanjkanje kisika in velika količina nutrientov (Huber in sod., 2004). Odkrili so, da je mikrobiota v prebavilih rib strukturno in funkcionalno drugačna kot pri endotermnih organizmih tudi zaradi nizke okoljske in posledično nizke telesne temperature (Holben in sod., 2002).

#### 5.1.1.4 Odpornost proti protimikrobnim učinkovinam

Obravnavani sevi iz rodu *Aeromonas* so bili odporni proti eritromicinu, ampicilinu in streptomycinu. Pri dosedanjih raziskavah so bili sevi iz rodu *Aeromonas* prav tako večinoma odporni proti naštetim protimikrobnim učinkovinam (Bondi in sod., 2000; Son et al., 1997; Chaudhury in sod., 1996; Wang in Silva, 1999). Pri streptomycinu se je pri določenih raziskavah pokazala občutljivost sevov iz tega rodu (Wang in Silva, 1999), pri naši raziskavi se je pri 25 % sevov pojavila intermediarna odpornost proti tej protimikrobnii učinkovini, občutljivost pa le pri enem sevu. Pri raziskavi Chaudhurya in sodelavcev (1996) je bilo malo sevov odpornih proti nalidiksični kislini in trimetoprimu. Tudi pri obravnavanih sevih iz rodu *Aeromonas* je bilo le malo odpornih proti temu dvema protimikrobnima učinkovinama, in sicer je bilo le 19 % sevov odpornih proti nalidiksični kislini, proti trimetoprimu pa 25 %.

Sevi iz rodu *Aeromonas* so bili občutljivi za kloramfenikol, ciprofloxacin, cefuroksim in gentamicin. Občutljivost sevov za te protimikrobne učinkovine so zasledili tudi v nekaterih dosedanjih raziskavah (Son et al., 1997; Chaudhury in sod., 1996; Rahim in Aziz, 1994; Bondi in sod., 2000; Jones in Wilcox, 1995; Wang in Silva, 1999). 50 % testiranih sevov iz rodu *Aeromonas* je bilo občutljivih za cefotaksim, občutljivost tega rodu za cefotaksim so potrdili tudi Bondi in sodelavci (2000). Son in sodelavci (1997) so pri predstavnikih iz tega rodu potrdili odpornost proti tetraciklinu, v okviru naše raziskave pa so bili za tetraciklin vsi sevi občutljivi.

Pri nekaterih raziskavah obstajajo podatki o odpornosti le za celotne skupine protimikrobnih učinkovin, in sicer so bili sevi iz rodu *Aeromonas* občutljivi za karbapeneme (Jones in

Wilcox, 1995) kamor spada tudi imipenem, občutljivost za katerega smo dokazali tudi v okviru naše raziskave.

Študija Chaundrya in sodelavcev (1996) je pokazala potencialno naraščajočo odpornost proti številnim protimikrobnim učinkovinam pri kliničnih in okoljskih sevih iz rodu *Aeromonas*, kar smo potrdili tudi v okviru naše raziskave, saj je bila večina sevov odpornih na več kot dve protimikrobni učinkovini. Odpornost na največje število protimikrobnih učinkovin je imel sev A4, in sicer 10. Največ sevov (38 %) je bilo odpornih proti štirim protimikrobnim učinkovinam.

O odpornosti proti protimikrobnim učinkovinam pri rodu *Shewanella* je le malo podatkov. Vay in sodelavci (2005) so opisali vrsto *S. putrefaciens-algae* kot dokaj občutljivo za protimikrobne učinkovine. Bakterije iz tega rodu naj bi bile odporne proti tetraciklinu (Dang in sod., 2008), vrsta *S. algaе* pa proti imipenemu (Kim in sod., 2006). V okviru naše raziskave odpornosti proti tetraciklinu nismo popolnoma potrdili, saj se je ta pojavila le pri 21 % sevov iz tega rodu. Prav tako tudi ne odpornosti proti imipenemu, ki se je pojavila pri enakem deležu sevov iz tega rodu.

Kubisz in sodelavci (2008) so vrsto *Serratia marcescens* omenili kot vrsto z največjim odstotkom sevov odpornih proti številnim protimikrobnim učinkovinam, kar so ugotovili pri zdravljenju bolezni, ki jih ta vrsta povzroča. Sevi vrste *Serratia marcescens* naj bi bili po podatkih preteklih raziskav odporni proti cefotaksimu (Ivanova in sod., 2008), česar v okviru naših raziskav nismo potrdili, saj je bila večina sevov iz tega rodu občutljivih za cefotaksim. V nekaterih raziskavah so bili sevi iz tega rodu proti gentamicinu odporni (Ivanova in sod., 2008) kot tudi občutljivi (Engel in sod., 2009). Pri nas je bil proti gentamicinu odporen le en sev, dva seva sta bila občutljiva, stanje pri treh pa je bilo intermediarno.

Sevi iz rodu *Serratia* naj bi bili odporni tudi proti tetraciklinu in kloramfenikolu (Ivanova in sod., 2008). Dva obravnavana seva sta bila proti tetraciklinu odporna, stanje pri ostalih štirih sevih tega rodu pa je bilo intermediarno. Za kloramfenikol je bilo 50 % sevov občutljivih, ostali pa so bili intermediarni. Za tetraciklin so se naši rezultati le delno skladali s tistimi, ki so bili pridobljeni pred našo raziskavo, za kloramfenikol pa so bili naši rezultati povsem drugačni. Sevi iz rodu *Serratia* so bili občutljivi za ciprofloksacin (Engel in sod., 2009), kar smo za večino sevov tega rodu potrdili tudi mi.

Vrsta *Bacillus cereus* je omenjena kot odporna na številne protimikrobne učinkovine (Latha in sod., 2009). Izolati te vrste so odporni proti eritromicinu, občutljivi pa za ciprofloksacin (Ko in sod., 2007). V okviru naših raziskav je bilo stanje odpornosti proti eritromicinu intermediarno, za ciprofloksacin pa so bili vsi sevi občutljivi kot v raziskavi Ko-ja in sodelavcev.

Pri nekaterih sevih vrste *Bacillus cereus* so odkrili odpornost proti karbapenemom (Katsuya in sod., 2009; Kiyomizu in sod., 2008). V to skupino spada tudi imipenem, za katerega smo ugotovili, da so bili vsi sevi iz rodu *Bacillus* skupine d nanj občutljivi. Odpornost rodu *Bacillus* proti makrolidom in kinolonom so potrdili Brook in sodelavci (2001). Naši rezultati se od teh nekoliko razlikujejo. Obravnavani sevi iz tega rodu izolirani v okviru naše raziskave so bili za oba predstavnika skupine makrolidov ali občutljivi (azitromicin) ali pa intermediarni (eritromicin). Prav tako smo drugačne rezultate dobili pri kinolonih, saj so bili vsi sevi za oba predstavnika, nalidiksično kislino in ciprofloksacin, občutljivi. Opazili so tudi pogosto odpornost proti betalaktamom, vključno s penicilini in cefalosporini (Katsuya in sod., 2009). Podatki se ujemajo tudi z našimi rezultati, saj so bili vsi obravnavani sevi iz rodu *Bacillus* iz skupine d odporni proti ampicilinu, cefotaksimu in cefuroksimu, ki spadajo v prej omenjene skupine.

### 5.1.2 Prisotnost plazmidov v izoliranih sevih

Večina najdenih plazmidov je bila prisotna pri rodovih *Shewanella* in *Aeromonas*, in sicer je šlo za »velike« plazmide, večje od 20 kb. Pristonost plazmidov smo skušali povezati z odpornostjo proti protimikrobnim učinkovinam. Pomagali smo si z dosedanjimi raziskavami pojavljanja genov za odpornost proti določenim protimikrobnim učinkovinam na plazmidih pri obravnavanih rodovih.

Pri rodu *Aeromonas* smo našli plazmide, večje od 20 kb. Podobno so pri vrsti *Aeromonas hydrophila* našli plazmide velike 3 do 63,4 kb (Son et al., 1997). Pri raziskavi Chaudhurya in sodelavcev (1996) so pri rodu *Aeromonas* našli precej večje plazmide velike med 85,6 kb in 150 kb.

Plazmidi so se pri obravnavanih sevih rodu *Aeromonas* pojavili skupaj z odpornostmi proti različnim številom protimikrobnih učinkovin, od dve do deset. Prisotnost plazmidov pri rodu

*Aeromonas* so v preteklih raziskavah povezali z odpornostjo proti ampicilinu (Son et al., 1997; Chaudhury in sod., 1996), tetraciklinu (Son et al., 1997) in eritromicinu (Chaudhury in sod., 1996). Determinante odpornosti proti ampicilinu so lahko kodirane na plazmidih ali kromosomih (Chaudhury in sod., 1996). Pri naši raziskavi so plazmide imeli le nekateri sevi, ki so bili odporni proti ampicilinu, zato smo sklepali, da je bila odpornost proti tej protimikrobnii učinkovini verjetno posledica zapisa na kromosому. Podobne rezultate kot za ampicilin smo dobili pri eritromicinu. Za tetraciklin pa so bili vsi sevi občutljivi.

Pri rodu *Shewanella* smo našli poleg »velikih« tudi »majhne« plazmide, velike 1500 bp do 2500 bp. Pojavljajo se pri sevih z odpornostjo proti različnemu številu protimikrobnih učinkovin, od 2 do 6. Plazmide smo izolirali iz skoraj vseh sevov, kjer smo njihovo prisotnost preverjali. Povezave med plazmidimi in odpornostjo proti protimikrobnim učinkovinam pri rodu *Shewanella* v literaturi nisemo zasledili.

Nedavno je bil pri rodu *Shewanella* odkrit skrit, nejasen plazmid, brez homologije z drugimi znanimi plazmidimi. Njegova velikost je bila 8021 bp. Do objave te raziskave je bilo le malo podatkov o naravno prisotnih plazmidih pri okoljskih izolatih vrst iz tega rodu. Ta plazmid bi lahko bil uporaben pri izdelavi vektorjev za kloniranje in shuttle vektorjev za psihrotrofne, na hladno prilagojene bakterije (Werbowy in sod., 2009).

Naša predvidevanja smo skušali potrditi tudi s kloniranjem plazmidov in določanjem njihovega nukleotidnega zaporedja, z njihovim prenosom v druge seve – konjugacijo ter preverjanjem prisotnosti genov za ESBL in Qnr proteine.

### 5.1.3 Konjugacija

Prenos plazmidov s konjugacijo nam kljub večkratnemu poskušanju ni uspel.

Pri rodu *Aeromonas* so že uspešno prenesli plazmide v druge seve. Prenos plazmida in z njim povezane odpornosti so dosegli pri enem od sedmih sevov, pri katerih so našli plazmide. Poročali so, da bi pri drugačnih pogojih oz. drugih recipientih verjetno lahko dosegli boljši rezultat prenosa (Son et al., 1997), kar bi verjetno veljalo tudi za izolirane seve v okviru naših raziskav.

Veliko boljši rezultat prenosa plazmidov so dosegli Chaudhuy in sodelavci leta 1996, kjer je kar 25 od 35 sevov iz rodu *Aeromonas*, pri katerih so našli plazmide, svojo odpornost preneslo na recipientski sev vrste *E.coli*.

#### **5.1.4 Identifikacija ESBL producirajočih sevov**

ESBL producirajoče seve smo iskali s pomočjo difuzijske metode z diskami (CAZ in CAZ/CLA, CT/CLA) in E testom (CT/CTL). Za potencialno pozitiven sev iz rodu *Acinetobacter* se je izkazalo, da verjetno ne producira ESBL, saj je bilo pri tem rodu dokazano, da inhibicija s klavulansko kislino, pri čemer je njena koncentracija enaka ali nižja od 16 mg/L, kot je bila tudi pri nas, daje lažno pozitiven test prisotnosti ESBL (Beceiro in sod., 2008).

Sev S2 iz rodu *Shewanella* je bil za cefotaksim občutljiv, ob prisotnosti klavulanske kislina pa odporen. To je verjetno posledica prisotnosti kromosomske kodirane cefalosporinaze (AmpC), ki spadajo med beta-laktamaze. Njihovo delovanje običajni inhibitorji beta-laktamaz, kot je klavulanska kislina ne inhibirajo, ampak inducirajo odpornost. Geni za te encime pa se lahko pojavljajo tudi na plazmidih.

Prisotnost ESBL producirajočih sevov smo testirali tudi s pomnoževanjem delov genov z začetnimi oligonukleotidi panCTX, TEM, SHV in DHA. Ustrezno velike produkte smo dobili pri dveh sevih iz rodu *Shewanella*, pri enim z začetnim oligonukleotidom panCTX in pri drugem z začetnim oligonukleotidom SHV. Prav tako smo dobili ustrezno velik produkt z začetnim oligonukleotidom panCTX pri sevu, ki je bil glede na morfologijo določen za pripadnika rodu *Aeromonas*. Določitev zaporedja pomnoženih delov teh genov nam ni uspela.

O beta-laktamazah z razširjenim spektrom delovanja (ESBL) so od prisotnih rodov poročali le pri rodu *Serratia* (Ku in sod., 2008; Ivanova in sod., 2008; Empel in sod.; 2008; Jeong in sod., 2008; Mlynarczyk in sod, 2007; Crivaro in sod., 2007). Pri raziskavi Empela in sodelavcev (2008) so med ESBL dominirale CTX-M podobne beta-laktamaze, s SHV tipom in TEM podobnimi encimi. Našli so tudi plazmide, ki so vsebovali *bla(SHV-12)*, *bla(TEM-1)* in *aac(6')-lb* gene (Crivaro in sod., 2007).

#### **5.1.5 Identifikacija sevov s plazmidno kodirano odpornostjo proti kinolonom (QNR)**

Pri nobenem od testiranih sevov nismo zasledili ustreznega PCR pomnožka delov genov *qnr*.

Pri rodu *Aeromonas* so potrdili prisotnost gena *qnrS*. Ta je imel za posledico zmanjšano občutljivost za vse kinolone in florokinolone (Picão in sod., 2008; Cattoir in sod., 2008). Gen *qnrS* je bil skupaj z *aac(6')-lb-cr* determinantno in različnimi markerji za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam na istem plazmidu (Picão in sod., 2008). Identifikacija tega gena na plazmidu izven družine Enterobacteriaceae kaže na možno razpršitev teh determinant za odpornost znotraj po Gramu negativnih sevov (Cattoir in sod., 2008).

Vrsto *Shewanella algae* so določili za izvor in rezervoar gena *qnrA*, plazmidno kodirane Qnr determinante (Nordmann in Poirel, 2005; Poirel in sod., 2005a). Tudi druge psihrofilne vrste naj bi bile rezervoarji determinant plazmidne kinolonske odpornosti, *qnrB* in *qnrS*. Najdbe kažejo na to, da so po Gramu negativne bakterijske vrste v okolju možni rezervoarji nastajajočih genov za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam. Verjetni rezervoarji teh genov so predvsem vodna okolja (Poirel in sod., 2005).

Pri po Gramu pozitivnih bakterijah, tudi pri rodu *Bacillus*, so odkrili Qnr podobne ponovljene proteine, ki so vplivali na odpornost proti kinolonom (Rodríguez-Martínez in sod., 2008).

### **5.1.6 E test za moksifloksacin**

Moksifloksacin je toksičen kinolon tretje generacije. Kljub pomanjkanju enotnih interpretacij rezultatov pridobljenih z E testi za to protimikrobovo učinkovino v preteklih raziskavah smo se za njeno uporabo vseeno odločili, saj smo v okviru določanja fenotipskih lastnosti uporabili tudi druge kinolone. Uporabili smo kinolon prve generacije nalidiksično kislino in kinolon druge generacije ciprofloksacin. Prav tako je odpornost proti kinolonom zaradi mobilnosti in razširjanja trenutno zelo aktualna.

### **5.1.7 Zaviranje rasti izoliranega seva iz rodu *Bacillus* skupine d**

Izoliran sev iz rodu *Shewanella* je zaviral rast seva iz rodu *Bacillus* skupine d. Znano je, da lahko nekateri predstavniki mikrobiote kontrolirajo rast drugih prisotnih mikroorganizmov (Rawls in sod., 2004).

### 5.1.8 Protiglivno delovanja seva iz rodu *Alcaligenes*

Sev Al iz rodu *Alcaligenes* je zaviral rast nedefinirane glive. Znano je, da nekatere vrste iz tega rodu proizvajajo metabolite, ki delujejo proti glivam (Dwivedi in sod., 2009; Sayyed in Chincholkar, 2009; Vaidya in sod., 2003).

Glede na to, da smo ta bakterijski sev izolirali iz ust, bi ta lahko potencialno izviral iz okolja ali pa celo iz kože. Dokazano je bilo, da kožo dvoživk pokrivajo številni kožni mikrobi, od katerih so nekatere vrste sposobne zavirat rast gliv, ki so pri žabah krive za množično umiranje (Rollins-Smith, 2009; Woodhams in sod., 2007). Bakterije z protiglivno aktivnostjo so našli tudi pri močeradih (Rollins-Smith, 2009).

Sev iz tega rodu smo izolirali tudi iz debelega črevesa. Njegovega vpliva na rast gliv pa nismo preverjali.

### 5.1.9 Možni viri diverzitete bakterijskih rodov v prebavilih močerila

Na podlagi sekvenciranja genov za 16S rRNA izoliranih sevov iz prebavil močerila bi lahko sklepali, da so bakterijske združbe v prebavilu močerila dokaj monotone, saj smo kljub večjemu številu predvideno različnih izolatov (več kot 65) dobili le 12 različnih rodov. A smo z določanjem nekaterih fenotipskih lastnosti ugotovili, da se izolati, kljub temu da spadajo v isti rod, med seboj razlikujejo in da gre verjetno za različne vrste iz istega rodu oziroma sev znotraj posameznih vrst. Tako smo ugotovili, da je združba bakterij v prebavilih močerila kljub maloštevilnim rodovom dokaj heterogena.

Dokazano je, da bakterije, ki kolonizirajo prebavni trakt, izvirajo iz okolja (Hubert in sod., 2004; Bates in sod., 2006). V prebavilih so selekcionirane po njihovi sposobnosti preživetja znotraj te niše (Hubert in sod., 2004; Bates in sod., 2006). Na mikrobioto prebavil pri ribah vplivajo predvsem nizek pH, pomanjkanje kisika in obilna količina nutrientov (Huber in sod., 2004). Mikrobne skupnosti se vzpostavijo v določenem času razvoja, ponavadi preden gostitelj odraste (Bates in sod., 2006). Pri ribah pride do kolonizacije prebavil z bakterijami kmalu po njihovi izvalitvi (Bates in sod., 2006). Tipična mikrobiota v prebavilih žab se ohranja z reprodukcijo prvotne tudi med hibernacijo in med stradanjem, torej pri nizkih temperaturah in ob pomanjkanju hrane (Gossling in sod., 1982 a; Gossling in sod., 1982 b), kar je značilno tudi za življenske razmere močerila.

Hubert in sodelavci (2004) so ugotovili, da se mikrobiota v prebavilih rib lahko spreminja glede na sezono, predvsem zaradi sprememb temperature. Slednje za močerila verjetno ne velja, saj so razmere v katerih živi, vsaj kar se temperature tiče dokaj stalne. Je pa dokazano črevesna mikrobiota pri ljudeh kvalitativno odvisna od prehrane (Brock in sod., 1994), ki se tudi pri močerilu sezonsko spreminja (Bulog in sod., 2000).

Z industrijsko in komunalno onesnaženimi vodami prihajajo v podzemlje strupene in nevarne snovi, kot so umetna gnojila, pesticidi, kovine in druge polutanti

([http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)). Zaradi kemijskega onesnaženja se lahko izselekcionirajo geni za odpornost proti protimikrobnim učinkovinam, pri čemer nastanejo sevi, odporni proti številnim protimikrobnim učinkovinam (gre predvsem za nespecifične odpornosti s pomočjo črpalk; prisotnosti teh determinant nismo preverjali). To je eden od možnih razlogov za prisotnost odpornosti proti številnim protimikrobnim učinkovinam pri bakterijah izoliranih iz prebavil močerila. Mikroorganizmi iz vodnih okolji in prebavil prihajajo redno v kontakt z mikroorganizmi, ki nosijo prenosljive plazmide z odpornostjo proti protimikrobnim učinkovinam (Chaudhury in sod., 1996).

Da bi lahko natančneje določili vplive onesnaženih rek in nasploh vode v kateri močeril živi na pojavljanje bakterij v njegovih prebavilih in odpornosti le-teh proti protimikrobnim učinkovinam, bi bilo potrebno raziskati kateri rodovi so prisotni v vodi, kjer smo močerila našli, in kakšne so njihove lastnosti.

Po podatkih iz literature so izolati iz vodnih vzorcev jame, ki jih je bilo možno gojiti, večinoma vsebovali po Gramu negativne bakterije (72,7 %), med katerimi so najpogosteje naleteli na proteobakterije (Ikner in sod., 2006; Macalady in sod., 2006; <http://quest.nasa.gov/projects/spacewardbound/docs/lifeincaves.pdf>). Tudi v naši raziskavi so v prebavilih močerila prevladovale po Gramu negativne bakterije, od teh pa prav tako proteobakterije. V raziskavah Iknerja in sodelavcev (2006) so iz kapljajoče vode v jamah pogosto izolirali rodove *Aeromonas*, *Acinetobacter* in *Serratia*. Od po Gramu pozitivnih bakterij so v jamah našli rodu *Bacillus* iz debla Firmicutes (Ikner in sod., 2006; <http://quest.nasa.gov/projects/spacewardbound/docs/lifeincaves.pdf>; Laiz in sod., 1999). Omenjene rodove smo iz prebavil močerila izolirali tudi pri naših raziskavah.

Navedeni podatki o bakterijah v jamah se nanašajo predvsem na bakterije izolirane iz kapljajoče vode, predvsem tiste, ki polzi po stenah jam. Kjub temu, da se močeril občasno nahaja na poplavnih območjih na mejah podzemnih rek, se večinoma zadržuje v nekoliko večjih vodnih telesih, v sveži oksigenirani vodi (Culver, 2005). Tako bi bila ustreznješa primerjava bakterij izoliranih iz prebavil močerila z bakterijami izoliranimi iz tekočih vod. Nekateri rodovi, ki smo jih izolirali iz prebavil močerila, so bili izolirani tudi iz rek. Bakterije iz rodu *Aeromonas* so značilni sladkovodni mikroorganizmi (Jiravanichpaisal in sod., 2009; Krejcí in sod., 2009; Khan in sod., 2008; Chaudhury in sod., 1996). Bakterije iz rodu *Shewanella* so prav tako razširjene v vodnih okoljih (Werbowy in sod., 2009; Yang in sod., 2006; Yilmaz in sod., 2007). Iz rek so izolirali tudi predstavnike iz rodu *Serratia* (Kafilzadeh in Mirzaei, 2008; Belt in sod., 2007) in *Bacillus* (Fakhfakh in sod., 2009; Tiquia in sod., 2008).

## 5.2 SKLEPI

- Mikrobiota v prebavilih močerila je kljub majhnemu številu rodov zelo heterogena. Največ različnih izoliranih sevov je pripadalo po Gramu negativnim bakterijam. Vseh različnih rodov je bilo 12, najpogosteje izolirani sevi so pripadali rodovom *Aeromonas*, *Shewanella*, *Serratia* in *Bacillus* skupine d.
- Največje število bakterijskih kolonij se je pojavilo na ploščah z vzorci iz debelega črevesa (plošče so bile najbolj poraščene z bakterijskimi kolonijami). Prav tako se je na teh ploščah pojavilo največje število različnih rodov.
- Hemolitično aktivnost smo zasledili pri večini sevov iz rodov *Aeromonas* in *Bacillus* skupine d, ne pa tudi pri sevih iz rodov *Shewanella* in *Serratia*.
- Sevi iz rodov *Shewanella* in *Aeromonas* so večinoma rasli na gojiščih s hitinom ali celulozo kot edinim virom ogljika, nekoliko pa se je razlikovala uspešnost rasti na posameznih gojiščih.
- Izolirani sevi so večinoma rasli pri širokem razponu temperatur ( $7\text{-}37^{\circ}\text{C}$ ), pri katerih smo testirali njihovo rast. Uspešnost rasti pa se je pri različnih temperaturah

razlikovala. Pri temperaturi 37°C je rasel manjši delež vseh izoliranih sevov iz rodov *Shewanella* in *Aeromonas*.

- Večina sevov posameznih rodov je bila odpornih proti številnim protimikrobnim učinkovinam. Največ izolatov iz rodov *Aeromonas* in *Bacillus* skupine d je bilo odpornih proti štirim protimikrobnim učinkovinam, največ izoliranih sevov iz rodu *Shewanella* in *Serratia* pa proti šestim protimikrobnim učinkovinam. Sev iz rodu *Aeromonas* je bil odporen proti desetim, sev iz rodu *Shewanella* pa celo proti enajstim protimikrobnim učinkovinam hkrati.
- Plazmidi so se večinoma pojavljali pri sevih iz rodov *Aeromons* in *Shewanella*. Kloniranje fragmentov manjših plazmidov in določitev njihovega zaporedja nukleotidov nam ni uspelo. Tudi pri prenosu plazmidov v recipientske seve *E. coli* s konjugacijo nismo bili uspešni.
- ESBL producirajočih sevov s pomočjo diskov z ustreznimi protimikrobnimi sredstvi in E testom nismo našli. Prav tako nismo potrdili prisotnosti zapisov za te encime, saj nismo uspeli določiti zaporedja nukleotidov ustrezno velikih PCR pomnožkov z začetnimi oligonukleotidi panCTX in SHV. Tudi genov genov *qnr* in *aac(6')-lb-cr* za odpornost proti kinolonom nismo našli..
- Sev iz rodu *Shewanella* je zaviral rast seva iz rodu *Bacillus* skupine d, sev iz rodu *Alcaligenes* pa rast nedefinirane glive.

## 6 POVZETEK

V naših raziskavah smo se ukvarjali z mikrobioto izolirano iz različnih delov prebavil človeške ribice (*Proteus anguinus*). Človeška ribica je edini jamski vretenčar, ki ima razširjenost omejeno na Dinarski kras. Vse življenje ohrani nekatere juvenilne značilnosti, zanjo pa so značilne tudi številne troglomorfne značilnosti, s katerimi je prilagojena na življenje v jamskih vodah.

O mikrobioti v prebavilih močerila do sedaj še ni bilo veliko znanega. Mikrobiota v prebavilih je pomembna, ker prispeva k normalnem razvoju in fiziologiji organizma, vpliva pa tudi na številne biološke procese.

Nekatere izolirane seve smo do rodov določili s pomočjo sekvenciranja delov genov za 16S rRNA. Preostale seve smo okvirno uvrstili na podlagi morfoloških podobnosti z zanimi, do rodu določenimi sevi in barvanjem po Gramu.

Večina različnih izoliranih sevov je bila po Gramu negativnih. Od dvanajstih prisotnih rodov, so bili najbolj zastopani *Aeromonas*, *Shewanella*, *Serratia* in *Bacillus* skupine d. Največje število bakterijskih kolonij se je pojavilo na ploščah z vzorci iz debelega črevesa, prav tako se je na teh ploščah pojavilo največje število različnih rodov.

Pestrost znotraj izoliranih rodov smo ugotavliali s pomočjo nekaterih fenotipskih lastnosti. Izolirani sevi so bili odporni proti različnim protimikrobnim učinkovinam, kar smo večinoma preverjali z difuzijsko metodo z diskami. Največ izolatov iz rodov *Aeromonas* in *Bacillus* skupine d je bilo odpornih proti štirim protimikrobnim učinkovinam, največ izoliranih sevov iz rodu *Shewanella* in *Serratia* pa proti šestim protimikrobnim učinkovinam. Sevi so različno dobro rasli pri temperaturah od 7°C do 37°C. Pri temperaturi 37°C je rasel manjši delež vseh izoliranih sevov iz rodov *Shewanella* in *Aeromonas*. Hemolitično aktivnost smo preverjali z rastjo na krvnem agarju in jo zasledili pri večini sevov iz rodov *Aeromonas* in *Bacillus* skupine d. Večina sevov iz rodov *Shewanella* in *Aeromonas* je rasla na gojiščih s hitinom ali celulozo kot edinim virom ogljika, nekoliko pa se je razlikovala uspešnost rasti na posameznih gojiščih. Na podlagi preverjanja omenjenih fenotipskih lastnosti smo ugotovili, da je bakterijska združba prebavil močerila, kljub maloštevilnim rodovom, precej heterogena.

Pri izoliranih sevih smo ugotavliali tudi prisotnost plazmidov, ki smo jih večinoma zasledili pri sevih iz rodov *Aeromonas* in *Shewanella*. Linearne fragmente nekaterih manjših plazmidov smo z vektorjem pUC19 skušali prenest v sev *E. coli*, v katerem bi te fragmente pomnožili, jih spet izolirali in določili njihovo zaporedje nukleotidov. Sestave izoliranih plazmidov nam ni uspelo določiti. Prav tako nam ni uspel prenos plazmidov v recipientske seve *E. coli* s konjugacijo.

Ugotavliali smo možne determinante odpornosti proti različnim protimikrobnim učinkovinam. Skušali smo odkrit seve, ki proizvajajo ESBL oz. imajo zapise za te encime ali pa vsebujejo determinante odpornosti proti kinolonom *qnr* ali *aac(6')-lb-cr*. Omenjenih determinant odpornosti pri izoliranih sevih nismo odkrili.

Nekateri sevi so zavirali rast drugih sevov oz. prisotnih gliv. Sev iz rodu *Shewanella* je zaviral rast seva iz rodu *Bacillus* skupine d, sev iz rodu *Alcaligenes* pa rast nedefinirane glive.

## 7 VIRI

- Adams L, Boopathy R. 2005. Isolation and characterization of enteric bacteria from the hindgut of Formosan termite. *Bioresource Technology*. 96, 14: 1592-1598.
- Al-Harbi AH, Uddin MN. 2005. Microbial quality changes in the intestine of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* X *Oreochromis aureus*) in fresh and frozen storage condition. *Letters in Applied Microbiology*. 40: 486-490.
- AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. 2009. Berkeley, California: AmphibiaWeb. <http://amphibiaweb.org/>. (23. maj 2009).
- Astatner B, Jones MJ, George WL. 1988. Effect of Incubation Temperature on growth and Soluble Protein Profiles of Motile Seromonas Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. Feb., 392-393.
- Azambuja P, Feder D, Garcia ES. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental parasitology*. 107, 1-2: 89-96.
- Baesman SM, Stoltz JF, Kulp TR, Oremland RS. 2009. Enrichment and isolation of *Bacillus beveridgei* sp. nov., a facultative anaerobic haloalkaliphile from Mono Lake, California, that respires oxyanions of tellurium, selenium, and arsenic. *Extremophiles*. Epub ahead of print.
- Barton HA in Jurado V. What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves. <http://quest.nasa.gov/projects/spacewardbound/docs/lifeincaves.pdf> (27. junij 2009)
- Bast DJ, Athamna A, Duncan CL, de Azavedo JC, Low DE, Rahav G, Farrell D, Rubinstein E. 2004. Type II topoisomerase mutations in *Bacillus anthracis* associated with high-level fluoroquinolone resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54, 1: 90-94.
- Bates JM, Mittge E, Kuhlman J, Baden KN, Cheesman SE, Guillman K. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*. 297, 374-386.
- Beceiro A, Fernández-Cuenca F, Ribera A, Martínez-Martínez L, Pascual A, Vila J, Rodríguez-Baño, Cisneros JM, Pahón , Bou G. 2008. False extended-spectrum β-lactamase detection in *Aconetobacter* spp. due to intrinsic susceptibility to clavulanic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61: 301-308.
- Beecher DJ, Wong AC. 2005. Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *The Journal of Biological Chemistry*. 272, 1: 233-239.

- Belt KT, Hohn C, Gbakima A, Higgins JA. 2007. Identification of culturable stream water bacteria from urban, agricultural, and forested watersheds using 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Water and Health*. 5, 3: 395-406.
- Bischoff KM, Rooney AP, Li XL, Liu S, Hughes SR. 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*. 28, 21: 1761-1765.
- Bizjak Mali L. 1995. Histološke, histokemijske in ultrastrukturne analize prebavnega trakta močerila (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). Magistrsko delo.
- Bondi M, Messi P, Guerrieri E, Bitonte F. 2000. Virulence profiles and other biological characters in water isolated *Aeromonas hydrophila*. *The new microbiologica: official journal of the Italian Society for Medical, Odontiatric and Clinical Microbiology*. 23, 4: 347-356.
- Braun V, Günther H, Neuss B, Tautz C. 1985. Hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *Archives of microbiology*. 141, 4: 371-376.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1994. *Biology of Microorganisms*. Seventh edition. New Jersey, Prentice-Hall International, Inc: str 705-706.
- Brook I, Elliott TB, Pryor HI 2nd, Sautter TE, Gnade BT, Thakar JH, Knudson GB. 2001. In vitro resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 18, 6: 559-562.
- Bulog B, Bizjak Mali L, Kos M, Mihajl K, Prelovšek PM, Aljančič G. 2002. Biologija in funkcionalna morfologija človeške ribice (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). *Acta Biologica Slovenica*. 43, 3: 85-102.
- Bush K., Jacoby G. A, Madeiros A. A. 1995. A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233
- Centeno S, Calvo MA. 2001. Enzymatic activity of micro-organisms isolated from cork wine stoppers. *Microbios*. 106, 413: 69-73.
- Chang MC, Lai PL, Wu ML. 2004. Biochemical characterization and site-directed mutational analysis of the double chitin-binding domain from chitinase 92 of *Aeromonas hydrophila* JP101. *FEMS microbiology letters*. 232, 1: 61-66.
- Chaudhury A, Nath G, Shukla BN, Sanyal SC. 1996. Biochemical characterisation, entropathogenicity and antimicrobial resistance plasmids in clinical and environmental *Aeromonas* isolates. *Journal of medical microbiology*. 44, 6: 434-437.

- Crawford RL, Olson PE, Frick TD. 1979. Catabolism of 5-chlorosalicylate by a *Bacillus* isolated from the Mississippi River. *Applied and Environmental Microbiology*. 38, 3: 379-384.
- Crivaro V, Bagattini M, Salza MF, Raimondi F, Rossano F, Triassi M, Zarrilli R. 2007. Risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* and *Klebsiella pneumoniae* acquisition in a neonatal intensive care unit. 1: *The Journal of Hospital Infection*. 67, 2: 135-141.
- Culver D. 2005. *Encyclopedia of caves*. Amsterdam, Boston: Elsevier: Academic Press. Str.
- Dang H, Ren J, Song L, Sun S, An L. 2008. Diverse tetracycline resistant bacteria and resistance genes from coastal waters of Jiaozhou Bay. *Microbial Ecology*. 55, 2: 237-246.
- Drlica K. 1999. Mechanism of fluoroquinolone action. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 504-509.
- Duellman W. E., Truleb L. 1986. *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, United States of America.
- Dwivedi D, Johri BN, Ineichen K, Wray V, Wiemken A. 2009. Impact of antifungals producing rhizobacteria on the performance of *Vigna radiata* in the presence of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2009 May 21. [Epub ahead of print].
- Empel J, Baraniak A, Literacka E, Mrówka A, Fiett J, Sadowy E, Hryniewicz W, Gniadkowski M; Beta-PL Study Group. 2008. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52, 7: 2449-2454.
- Engel HJ, Collignon PJ, Whiting PT, Kennedy KJ. 2009. *Serratia* sp. bacteremia in Canberra, Australia: a population-based study over 10 years. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: official publication of European Society of Clinical Microbiology*. 28, 7: 821-824.
- Fakhfakh N, Kanoun S, Manni L, Nasri M. 2009. Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPk. *Canadian Journal of Microbiology*. 55, 4: 427-436.
- González-Rodríguez MN, Santos JA, Otero A, García-López ML. 2004. Hemolytic and proteolytic activities of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biovar *sobria* in broth and salmon extract at different temperatures. *Journal of food protection*. 67, 2: 278-284.

- Gossling J, Loesche WJ, Nace GW. 1982a. Large Intestine Bacterial Flora of Nonhibernating and Hibernating Leopard Frogs (*Rana pipenes*). Applied and environmental microbiology, July 1982, 59-66.
- Gossling J, Loesche WJ, Nace GW. 1982b. Response of Intestinal Flora of Laboratory-Reared Leopard Frogs (*Rana pipenes*) to Cold and Fasting. Applied and environmental microbiology, July 1982, 67-71.
- Gubina M, Ihan A. 2002. Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Ljubljana. Medicinski razgledi.
- Hameeda B, Reddy YH, Rupela OP, Kumar GN, Reddy G. 2006. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. Current Microbiology. 53, 4: 298-302.
- Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. 2004. Beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. Oral Microbiology and Immunology. 19, 5: 303-308.
- Hata M., Sizuki M., Matsumoto M., Takahashi M., Sato K, Ibe S., Sakae K. 2005. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49,2:801-803
- Héritier C, Poirel L, Nordmann P. 2004. Genetic and biochemical characterization of a chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing ambler class D beta-lactamase from *Shewanella algae*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 48, 5: 1670-1675.
- Herzog T. 2004. Razporeditev adipoznega tkiva in biokemijske analize tkiv močerilarjev (Amphibia: Proteidae). Diplomsko delo.
- Hird D W, Diesch S L, McKinnell R G, Gorham E, Martin F B, Meadows C A, Gasiorowski M. 1983. Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota Frogs and Tadpoles (*Rana pipenes*). Applied and environmental microbiology, 1423-1425.
- Holben WE, Williams P, Saarinen M, Särkilähti LK, Apajalahti JHA. 2002. Phylogenetic Analysis of Intestinal Microflora Indicates a Novel *Mycoplasma* Phylotype in Farmed and Wild Salmon. Microbial Ecology. 44: 175-185.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Chitin>  
(8. avgust 2009).
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Hemolysis>  
(3. julij 2009)
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Psychrotrophic\\_bacteria](http://en.wikipedia.org/wiki/Psychrotrophic_bacteria)  
(3. julij 2009)

[http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka\\_ribica](http://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Clove%C5%A1ka_ribica)

(19. junij 2009)

Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L. 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*. 96: 117-132.

Huck JR, Sonnen M, Boor KJ. 2008. Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *Journal of Dairy Science*. 91, 3: 1218-1228.

Ikner LA, Toomey RS, Nolan G, Neilson JW, Pryor BM, Maier RM. 2006. Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microbial ecology*. 53, 2: 30-42.

Irwin JA, Gudmundsson HM, Marteinsson VT, Hreggvidsson GO, Lanzetti AJ, Alfredsson GA, Engel PC. 2001. Characterization of alanine and malate dehydrogenases from a marine psychrophile strain PA-43. *Extremophiles: life under extreme conditions*. 5, 3: 199-211.

Ivanova D, Markovska R, Hadjieva N, Schneider I, Mitov I, Bauernfeind A. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Serratia marcescens* outbreak in a Bulgarian hospital.. *The Journal of Hospital Infection*. 70, 1: 60-65.

Ivanova EP, Nedashkovskaya OI, Sawabe T, Zhukova NV, Frolova GM, Nicolau DV, Mikhailov VV, Bowman JP. 2004. *Shewanella affinis* sp. nov., isolated from marine invertebrates. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 54, Pt4: 1089-1093.

J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature  
<http://www.bacterio.cict.fr/classification.html> (31. maj 2009)

Jacoby G. A. 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 2: 120-126

Jeong SH, Song W, Park MJ, Kim JS, Kim HS, Bae IK, Lee KM. 2008. Boronic acid disk tests for identification of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical isolates of Enterobacteriaceae producing chromosomal AmpC beta-lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31, 5:467-471.

Jiravanichpaisal P, Roos S, Edsman L, Liu H, Söderhäll K. 2009. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101, 1: 56-66.

- Jiravanichpaisal P, Roos S, Edsman L, Liu H, Söderhäll K. 2009. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Invertebrate Pathology. 101, 1: 56-66.
- Jones BL, Wilcox MH. 1995. *Aeromonas* infections and their treatment. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 35, 4: 453-461.
- Kafilzadeh F, Mirzaei N. 2008. Growth pattern of Hg resistant bacteria isolated from Kor River in the presence of mercuric chloride. Pakistan Journal of Biological Science. 11, 8: 2243-2248.
- Katsuya H, Takata T, Ishikawa T, Sasaki H, Ishitsuka K, Takamatsu Y, Tamura K. 2009. A patient with acute myeloid leukemia who developed fatal pneumonia caused by carbapenem-resistant *Bacillus cereus*. Journal of Infection and Chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 15, 1: 39-41.
- Khan R, Takahashi E, Nakura H, Ansaruzzaman M, Banik S, Ramamurthy T, Okamoto K. 2008. Toxin production by *Aeromonas sobria* in natural environments: river water vs. seawater. Acta Medica Okayama. 62, 6: 363-371.
- Khashe S in Janda JM. 1998. Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga*. Journal of clinical microbiology. 36, 3: 783-787.
- Kim DM, Kang CI, Lee CS, Kim HB, Kim EC, Kim NJ, Oh MD, Choe KW. 2006. Treatment failure due to emergence of resistance to carbapenem during therapy for *Shewanella algae* bacteremia. Journal of Clinical Microbiology. 44, 3:1172-1174.
- Kiyomizu K, Yagi T, Yoshida H, Minami R, Tanimura A, Karasuno T, Hiraoka A. 2008. Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia. Journal of Infection and Chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy. 14, 5: 361-367.
- Ko SY, Chung HJ, Sung HS, Kim MN. 2007. Emergence of beta-lactam-dependent *Bacillus cereus* associated with prolonged treatment with cefepime in a neutropenic patient. The Korean Journal of Laboratory Medicine. 27, 3: 216-220.
- Kojima M, Yoshikawa T, Ueda M, Nonomura T, Matsuda Y, Toyoda H, Miyatake K, Arai M, Fukamizo T. 2005. Family 19 chitinase from *Aeromonas* sp. No.10S-24: role of chitin-binding domain in the enzymatic activity. Journal of biochemistry. 137, 2: 235-242.
- Krejcí E, Sedláček I, Baudisová D. 2009. Classification of brown pigmented aeromonads isolated from river water. Folia Microbiologica (Praha). 54, 2: 123-129.
- Ku YH, Chuang YC, Yu WL. 2008. In vitro activity of tigecycline against clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*

- and *Enterobacter cloacae*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 41, 4: 332-336.
- Kubisz A, Kedzierska J, Kulig J. 2008. Etiological bacterial factors of respiratory system infections in the Intensive Care Unit Surgery Clinic Przeglad Lekarski 65, 6: 283-287.
- Laiz L, Groth I, Gonzalez I, Saiz-Jimenez C. 1999. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). Jornal of microbiological methods. 36, 1-2: 129-138.
- Latha C, Shriram VD, Jahagirdar SS, Dhakephalkar PK, Rojatkar SR. 2009. Antiplasmid activity of 1'-acetoxychavicol acetate from *Alpinia galanga* against multi-drug resistant bacteria. Journal of Ethnopharmacology. 123, 3: 522-525.
- Lin CS, Chen HC, Lin FP. 1997. Expression and characterization of the recombinant gene encoding chitinase from *Aeromonas caviae*. Enzyme and microbial technology. 21, 7: 472-475.
- Liu CL, Shen CR, Hsu FF, Chen JK, Wu PT, Guo SH, Lee WC, Yu FW, Mackey ZB, Turk J, Gross ML. 2009. Isolation and identification of two novel SDS-resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii*. Biotechnology Progress. 25, 1: 124-131.
- Liu J, Fang C, Jiang Y, Yan R. 2009. Characterization of a hemolysin gene *ytjA* from *Bacillus subtilis*. Current Microbiology. 58, 6: 642-647. Epub 2009 Mar 21.
- Livermore D. M. 1995.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews, 8: 557-584
- Livermore D. M. 1998.  $\beta$ -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41: 25-41
- Macalady JL, Lyon EH, Koffman B, Albertson LK, Meyer K, Galdenzi S, Mariani S. 2006. Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. Applied and environmental microbiology. 72, 8:5596-5609.
- MacFarlane RD, McLaughlin JJ, Bullock GL. 1986. Quantitative and qualitative studies of gut flora in striped bass from estuarine and coastal marine environments. Journal of Wildlife Diseases. 22, 3: 344-348.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th edition. Upper Saddle River, Prentice-Hall international
- Makino A, Nagashima H, Ohmae M, Kobayashi S. 2007. Chitinase-catalyzed synthesis of an alternatingly N-sulfonated chitin derivative. Biomacromolecules. 8, 1: 188-195.
- Mlynarczyk A, Mlynarczyk G, Pupek J, Bilewska A, Kawecki D, Łuczak M, Gozdowska J, Durlik M, Paczek L, Chmura A, Rowiński W. 2007. *Serratia marcescens* isolated in 2005

- from clinical specimens from patients with diminished immunity. Transplantation Proceedings. 39, 9: 2879-2882.
- Muhammad SA, Ahmad S, Hameed A. 2009. Report: Antibiotic Production by Thermophilic *Bacillus* specie SAT-4. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 22, 3: 339-45.
- Mulec J. Mikroorganizmi podzemlja: Primeri iz slovenskih kraških jam. Acta Carsologica. 37, 1: 153-160.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Kobayashi G. S., Pfaller M. A. 1999. Medical Microbiology. 4th ed. Misouri, Mosby, Inc.
- Năcescu N, Israil A, Cedru C, Caplan D. 1992. Hemolytic properties of some *Aeromonas* strains. Roumanian archives of microbiology and immunology. 52, 3: 147-156.
- Nordmann P, Poirel L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 56, 3: 463-439.
- Okitsu T, Suzuki R, Shimada T, Yamai S. 2000. Isolation of *Aeromonas* species from patients with sporadic diarrhea and characterisation of *Aeromonas hydrophila* isolates.
- Ouoba LI, Thorsen L, Varnam AH. 2008. Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. International Journal of Food Microbiology. 124, 3: 224-230.
- Paterson D. L., Bonomo R. A., 2005. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology reviews, 18,4: 657-686
- Poirel L, Carrér A, Pitout JD, Nordmann P. 2009. Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 53, 6: 2492-2498.
- Poirel L, Héritier C, Nordmann P. 2005b. Genetic and biochemical characterization of the chromosome-encoded class B beta-lactamases from *Shewanella livingstonensis* (SLB-1) and *Shewanella frigidimarina* (SFB-1). The journal of antimicrobial chemotherapy. 55, 5: 680-685.
- Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann. 2005a. Origin of Plasmid Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49,8: 3523-3525.
- Rahim Z in Aziz KM. 1994. Enterotoxigenicity, hemolytic activity and antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. isolated from freshwater prawn marketed in Dhaka, Bangladesh. Microbiology and immunology. 38, 10. 773-778.

- Rastogi G, Muppudi GL, Gurram RN, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR, Apel WA, Bang SS, Dixon DJ, Sani RK. 2009. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36, 4:585-598.
- Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 101, 13: 4596-4601.
- Richards GP, Watson MA, Crane EJ 3rd, Burt IG, Bushek D. 2008. *Shewanella* and *Photobacterium* spp. in oysters and seawater from the Delaware Bay. *Applied and environmental microbiology*. 74, 11: 3323-3327.
- Robicsek A., Jacoby A. G., Hooper D. C. 2006a. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 6: 629-640
- Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G. A., Macielag M., Abanat D., Hye Park C., Bush K., Hooper D. C. 2006b. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*, 12,1: 83-88
- Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo MC, Pascual A. 2008. Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 61, 6: 1240-1243.
- Rollins-Smith LA. 2009. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1788, 8: 1593-1599.
- Rossolini GM, Walsh T, Amicosante G. 1996. The *Aeromonas* metallo-beta-lactamases: genetics, enzymology, and contribution to drug resistance. *Microbial drug resistance*. 2,2: 245-252.
- Sayeed S, Saunders JR, Edwards C, Corkill JE, Hart CA. 1996. Expression of *Aeromonas caviae* bla genes in *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 38, 3: 435-441.
- Sayyed RZ, Chincholkar SB. 2009. Siderophore-producing *Alcaligenes faecalis* exhibited more biocontrol potential vis-à-vis chemical fungicide. *Current Microbiology*. 58, 1: 47-51.
- Shariff FM, Leow TC, Mukred AD, Salleh AB, Basri M, Rahman RN. 2007. Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: nutritional and physical factors. *Journal of Basic Microbiology*. 47, 5: 406-412.

- Shlaes D. M., Rice L. B. 1999. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. V: Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington, American Society for Microbiology Press: 1223-1241
- Son R, Rusul G, Sahiloh AM, Zainuri A, Raha AR, Salmah I. 1997. Antibiotic resistance and plazmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, Telapia (*Telapia mossambica*). Letters in applied microbiology. 24, 6: 479-82.
- Synstad B, Vaaje-Kolstad G, Cederkvist FH, Saua SF, Horn SJ, Eijsink VG, Sørlie M. 2008. Expression and characterization of endochitinase C from *Serratia marcescens* BJL200 and its purification by a one-step general chitinase purification method. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 72, 3: 715-723.
- Tadokoro T, Matsushita K, Abe Y, Rohman MS, Koga Y, Takano K, Kanaya S. 2008. Remarkable stabilization of a psychrotrophic RNase HI by a combination of thermostabilizing mutations identified by the suppressor mutation method. Biochemistry. 47, 31: 8040-8047.
- Thaenthanee S, Wong AC, Panbangred W. 2005. Phenotypic and genotypic comparisons reveal a broad distribution and heterogeneity of hemolysin BL genes among *Bacillus cereus* isolates. International Journal of Food Microbiology. 105, 2: 203-212.
- Thayer DW. 1978. Carboxymethylcellulase produced by facultative bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. Journal of General Microbiology. 106, 1: 13-18.
- Thorsen L, Budde BB, Koch AG, Klingberg TD. 2009. Effect of modified atmosphere and temperature abuse on the growth from spores and cereulide production of *Bacillus weihenstephanensis* in a cooked chilled meat sausage. International Journal of Food Microbiology. 130, 3: 172-178.
- Tiquia SM, Schleibak M, Schlaff J, Floyd C, Benipal B, Zakhem E, Murray KS. 2008. Microbial community profiling and characterization of some heterotrophic bacterial isolates from river waters and shallow groundwater wells along the Rouge River, southeast Michigan. Environmental Technology. 29, 6: 651-663.
- Tran J. H., Jacoby G. A. 2002. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 99: 5638-5642
- Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2005a. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49, 1: 118-125

- Tran J. H., Jacoby G. A., Hooper D. C. 2005b. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 7: 3050-3052.
- Tso MD, Dooley JS. 1995. Temperature-dependent protein and lipopolysaccharide expression in clinical *Aeromonas* isolates. *Jorunal of medical microbiology*. 42, 1: 32-38.
- Vaidya RJ, Macmil SL, Vyas PR, Ghetiya LV, Thakor KJ, Chhatpar HS. 2003. Biological control of Fusarium wilt of pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Millsp with chitinolytic *Alcaligenes xylosoxydans*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 41, 12: 1469-1472.
- Vay CA, Almuzara MN, Rodríguez CH, Pugliese ML, Lorenzo Barba F, Mattera JC, Famiglietti AM. 2005. 'In vitro' activity of different antimicrobial agents on Gram-negative nonfermentative bacilli, excluding *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. *Revista Argentina de Microbiologia*. 37, 1: 34-45.
- Wada M. 1993. Relationship between water pollution and bacterial flora in river water. *Nippon Eiseigaku Zasshi. Japanese journal of hygiene*. 48, 3: 707-720.
- Wang C in Silva JL. 1999. Pravalance snd characteristics of *Aeromonas* species isolated from processed channel catfish. *Journal of food protection*. 62, 1: 30-34.
- Werbowy K, Cieśliński H, Kur J. 2009. Characterization of a cryptic plasmnid pSFKW33 from *Shewanella* sp. 33B. *Plasmid*. 62, 1: 44-49.
- Wood SC, McCashion RN, Lynch WH. 1986. Multiple low-level antibiotic resistance in *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 29, 6: 992-996.
- Woodhams DC, Vredenburg VT, Simon MA, Billheimer D, Shakhtour B, Shyr Y, Briggs CJ, Rollins-Smith LA, Harris RN. 2007 Symbiotic bacteria contribute to innate immune defenses of the threatened mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*. *Biological Conservation*. 138, 3-4: 390-398.
- Yang C, Rodionov DA, Li X, Laikova ON, Gelfand MS, Zagnitko OP, Romine MF, Obraztsova AY, Nealson KH, Osterman AL. 2006. Comparative genomics and experimental characterization of N-acetylglucosamine utilization pathway of *Shewanella oneidensis*. *The Journal of biological chemistry*. 281, 40: 29872-29885.
- Yilmaz G, Aydin K, Bektas D, Caylan R, Caylan R, Koksal I. 2007. Cerebellar abscess and meningitis, caused by *Shewanella putrefaciens* and *Klebsiella pneumoniae*, associated with chronic otitis media. *Journal of Medical Microbiology*. 56, 11: 1558-1560.
- Zakariassen H, Aam BB, Horn SJ, Vårum KM, Sørlie M, Eijsink VG. 2009. Aromatic residues in the catalytic center of chitinase A from *Serratia marcescens* affect

processivity, enzyme activity, and biomass converting efficiency. The Journal of Biological Chemistry. 284, 16: 10610-10617.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za vodenje pri delu, njeno potrežljivost in prilagodljivost. Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Miklavžu Grabnarju.

Hvala vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko, še posebej Gregorju Bajcu in dr. Zdravku Podlesku ter Barbari Kastelic-Bokal iz Katedre za biologijo mikroorganizmov. Najlepša hvala tudi Brigit Nograšek, Idi Istenič in Sari Trontelj za pomoč v laboratoriju in moralno podporo. Hvala tudi drugim študentom, s katerimi smo skupaj delali v laboratoriju.

Hvala tudi Liljani Bizjak-Mali iz skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev, Oddelka za biologijo za posredovanje literaturo in pomoč pri pisanju.

Za finančno in moralno podporo se zahvaljujem staršem. Še posebej se zahvaljujem sestri Tei za motivacijo in potrpljenje med študijem.

Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani. Tanji, Petri, Živi, Katji K, Katji J, Špeli, Darki, Andreji, Larisi, Lari, Evi, Niki, Lei... Še posebej hvala Petri za lektoriranje. Se opravičujem, če sem koga pozabila.

## PRILOGA A

Sekvence pomnoženih delov genov za 16S rRNA

Rod *Aeromonas*

A1 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGA  
GTAATGCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATA  
CGCCCTACGGGGAAAGGAGGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTA  
GCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  
ACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGG  
GGGAAACCCCTGATGCGACGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCAGCTTCAGC  
GAGGAGGAAAGGTTGGTCGCTAATAACGCCAAGTGTACGTTACTCGCAGAAGAACCGGCT  
AACTCCGTGCCAGCAGCCCGTAATAACGGAGGGTGAAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAA  
AGCGCACGCAGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGGATTGCATTAA  
AAACTGTCCAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG  
CGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAC

A1 (1392)

TTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCG  
CTTTTGGGATTGCGCTCACTATCGCTAGCTTGACGCCCTGTACCGGCCATTGAGCACGTGTGTA  
GCCCTGGCCGTAAGGGCATGATGACTTGACGTCACTCCCTCCGGTTATCACCGGCAGT  
CTCCCTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGTTGCCTCGTTGCGGACTT  
AACCCAACATCTCACGACACCGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCGAAGGC  
ACTCCGTATCTCTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAAGGTTCTCGCTGCGTACGAA  
TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTTGCAGGGCC  
TACTCCCCAGGCGGTCGATTAACCGCTAGCTCCGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCAA  
ATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACTCTGTTGCTCCCCACGCTTGCACC  
TGAGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTGCCACCGTATTCCAGATCTACGCATTTC  
ACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTACAAGACTCTAGCTGGACAGTTAAATGCAATT

A2 (fd1)

AAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT  
GCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCT  
ACGGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTAGCTAGT  
TGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCAGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATGCCACACTG  
GAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGAAA  
CCCTGATGCGACGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCAGCTTCAGCGAGGAG  
GAAAGGTTGGCAGCTAATATCTGTCAAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAACCGGCTAACCTCG  
TGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAGCGCAC

GCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGATTGCATTAAAACGT  
TCAGCTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG  
AGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCTGTGCCT  
TGAGAC

A3 (fd1)

AAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT  
GCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCT  
ACGGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGATTAGCTAGT  
TGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG  
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGGGGAAA  
CCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCACTTCAGCGAGGAG  
GAAAGGTTGGCAGCTAATATCTGTAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAACCGGCTAACCTCG  
TGCCAGCAGCCCGGTAAACGGAGGGTCAAGCGTTACCGAATTACTGGCGTAAAGCGCAC  
GCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTAACCTGGATTGCATTAAAACGT  
TCAGCTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG  
AGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCTGTGCCT  
TGAGACGTGGCT

A3 (1392)

ATTCTGATTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTA  
CGACGCGCTTTGGGATTGCTCACTATCGCTAGCTGCAGCCCTCTGTACCGGCCATTGTAGCAC  
GTGTGTAGCCCTGGCGTAAGGGCATGATGACTGACGTCATCCCCACCTCCTCCGGTTATCAC  
CGGCAGTCTCCCTGAGITCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGTTGCCTCGITGC  
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCC  
CGAAGGCACTCCGTATCTTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTCGCTGTT  
CATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTT  
GCGGCCGTACTCCCCAGGCAGTCGATTACCGTTAGCTCCGGAAGCCACGTCTCAAGGACACAG  
CCTCAAATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTT  
TCGCACCTGAGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGTATTCCCTCAGATCTTAC  
GCATTTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGAACAGTT

A4 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGA  
GTAATGCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATA  
CGCCCTACGGGGAAAGGAGGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGATTAA  
GCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  
ACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGG

GGGAAACCTGATGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGC  
GAGGAGGAAAGGTTGGCAGCTAATATCTGTACGCTGTACGTTACTCGCAGAAGAACCGGCT  
AACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAA  
AGCGCACGCAGGCGGTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGATTGCATTAA  
AAACTGTTAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTAAATGCGTAGA  
GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCT  
GTGTCCCTGAGACGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAAATCGACCGCCTGG

A5 (fd1)

ATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAG  
TAATGCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATAC  
GCCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGATTAG  
CTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCAGCAGTCCACTACGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGGG  
CACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGGG  
GGAAACCTGATGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGCG  
AGGAGGAAAGGTTGGCGCTAATACGTGTCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAACCGGCTA  
ACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAACGGAATTACTGGCGTAAA  
GCGCACGCAGGCGGTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGGAATTGCATTAA  
AACTGTCCAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTAAATGCGTAGAG  
ATCTGGAGGAATACCGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCT  
GTGTCCCTGAGACGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAAATCGACCGCCTGG

A6 (fd1)

ATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAG  
TAATGCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATAC  
GCCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGATTAG  
CTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCAGCAGTCCACTACGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGGG  
CACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGGG  
GGAAACCTGATGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGCG  
AGGAGGAAAGGTTGGCGCTAATACGTGTCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAACCGGCTA  
ACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAACGGAATTACTGGCGTAAA  
GCGCACGCAGGCGGTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGGAATTGCATTAA  
AACTGTCCAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTAAATGCGTAGAG  
ATCTGGAGGAATACCGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCT  
GTGTCCCTGAGACGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAAATCGACCGCCTGG

A7 (fd1)

GCCTANNCATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCCGA  
CGGGTGAGTAATGCCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATA  
CCGCATACGCCCTACGGGGAAAGGAGGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGT  
GGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG  
ATCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTG  
ACAATGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCA  
CTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGCCTAATACGTGCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAC  
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTG  
GGCGTAAAGCGCACGCAGGCGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGGAAT  
TGCATTAAAACGTCCAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGAGCGGTGAAAT  
GCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGT  
GCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATT  
TGGAGGCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAACATGACCGCCTGGGAGTAC  
GGCCGCAAGGTTAAAACCAAATGAATTGANGGGCCCGACAAGCNGTGGA

A7 (1392)

GCGNATTCTGNTCGCATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGG  
ACTACGACCGCCTTTGGGATTGCTCACTATCGCTAGCTGCAGCCCTGTACCGCCATTGTA  
GCACGTGTGTAGCCCTGCCGTAAAGGCCATGATGACTGACGTACCCACCTCCTCCGGTTA  
TCACCGCAGTCTCCCTGAGTTCCCACCATACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGTTGCGCTCG  
TTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGA  
TTCCCGAAGGCACTCCGTATCTCTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTCGC  
GTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAA  
CCTTGCAGGCGTACTCCCCAGGCGGTGATTAAACCGTTAGCTCCGAAGCCACGTCTCAAGGAC  
ACAGCCTCAAATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACCTGTTGCTCCCCAC  
GCTTTCGACCTGAGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCT  
CTACGCATTCAACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGCTGGACAGTTAA  
ATGCAATTCCAGGTTGAGCCCAGGGCTTCACATCTAACCTATCCAACCGCCTGCGCTTAC  
GCCCAAGTAATTCCGATTAACCGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG  
GTGCTCTCTGCGAGTAACGTACAGTTGACACGTATTAGGCGCCAACCTTCCCTCGCTGAAA  
GTGCTTACAA

A8 (fd1)

ATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAG  
TAATGCCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATA  
GCCCTACGGGGAAAGGAGGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTAG  
CTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA  
CACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCAACATGGG  
GGAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCACTTCAGCG

AGGAGGAAAGGTTGGCAGCTAATATCTGTCACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAACCGGGCTA  
ACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAA  
GCGCACGCAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGATTGCATTAA  
AACTGTTAGCTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGAG  
ATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCT  
GTGTCCTTGAGACGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAACATCGACCGCTGGGGAGTACG

A9 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGTACTTTGCCGGCGAGCGCGGACGGGTGA  
GTAATGCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAACCGCATA  
CGCCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGATTAA  
GCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC  
ACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGG  
GGGAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCACTTCAGC  
GAGGAGGAAAGGTTGGCGCTAACACGTCAACTGTGACGTTACTCGCAGAAGAACCGGCT  
AACTCCGTGCCAGCAGCCCGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAA  
AGCGCACGCAGGCCGTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGATTGCATTAA  
AAACTGTCCAGCTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
GATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTGGAGGCT  
GTGTCCTTGAGACGTGGCTCCGGAGCTAACCGTTAAC

A9 (1392)

CGAGTTGCAGACTCCGATCCGACTACGACGCCCTTTGGATTGCTCACTATCGCTAGCTTGCA  
GCCCTCTGTACGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCTGCCGTAGGGCATGATGACTTGACGT  
CATCCCCACCTCCCTCCGGTTATCACCGCAGTCTCCCTGAGTCCCACCATTACGTGCTGGCAA  
CAAAGGACAGGGTTGCGCTCGTTGGACTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA  
GCCATGCAGCACCTGTGTTGATTCCGAAGGCACTCCGCATCTGCAGGATTCCAGACATGTC  
AAGGCCAGGTAGGTTCTCGCGTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCC  
CCGTCAATTCTGAGTTAACCTGCGCCGTACTCCCCAGGCCTGATTAAACCGTTAGCT  
CCGAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCAAATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGT  
ATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTGCACCTGAGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTC  
GCCACCGGTATTCCCTCCAGATCTCACGCTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCTCTACA  
AGACTCTAGCTGGACAGTTAACGCAATTCCAGGTTGAGCCGGGCTTCACATCTAACTTAT  
CCAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCGTATTACCGCG  
GCTGCTG

A10 (1392)

TTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCG  
CTTTTGGGATTCGCTCACTATCGTAGCTTGCAAGCCCTGTACCGGCCATTGAGCACGTGTGTA  
GCCCTGGCCGTAAAGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCGGTTATCACCAGGCACT  
CTCCCTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCCTCGTGCAGGACTT  
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTGATTCCGAAGGC  
ACTCCCGTATCTCTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTCGCGTGCATCGAA  
TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTTGCAGGCG  
TACTCCCCAGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCTCCAGGCAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCAA  
ATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTGCACC  
TGAGCGTCAGTCTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTTACGCATT  
ACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGAACAGTTAACATGCAATT  
AGGTTGAGCCCAGGGCTTCACATCTAACTTATCCAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATT  
CCGATTAACGCTTGCACCCCTCCGTATTACCGCGCTGCTG

A12 (fd1)

GCTTAACCATGCAAGTCGAACGGCAGCGAGAGAGAGCTGCTCTTGGCGCGAGTGGCGGAC  
GGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTAGCGGGGATAACTACTCGAAAGAGTGGCTAATAC  
CGCATA CGCCCTACGGGGAAAGGGGGGATCGCAAGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATC  
GGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTCACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTTGAGAGGACG  
ACCAGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGG  
ACAATGGGGAAACCTGATCCAGCCATCCC CGGTATGATGAAGGCCTCGGGTTGTAAAGTAC  
TTTGGCAGAGAAGAAAAGGTATCTCTTAATACGAGATACTGCTGACGGTATCTGAGAATAAGCA  
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTAACGGAATTACTGGG  
CGTAAAGCGTGTAGCGGGTCCGAAAGAAAGATGTGAAATCCAGGGCTAACCTTGGAACTG  
CATTTTAACTGCCGAGCTAGAGTATGTCAGAGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAATGC  
GTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA

A20 (1392)

TTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCG  
CTTTTGGGATTCGCTCACTATCGTAGCTTGCAAGCCCTGTACCGGCCATTGAGCACGTGTGTA  
GCCCTGGCCGTAAAGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCGGTTATCACCAGGCACT  
CTCCCTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCCTCGTGCAGGACTT  
AACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTGATTCCGAAGGC  
ACTCCCGTATCTCTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTCGCGTGCATCGAA  
TTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTTGCAGGCG  
TACTCCCCAGGCGGTCGATTTAACGCGTTAGCTCCAGGCAAGCCACGTCTCAAGGACACAGCCTCAA  
ATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTGCACC  
TGAGCGTCAGTCTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTTACGCATT  
ACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGAACAGTTAACATGCAATT

AGGTTGAGCCC GGCGCTTCACATCTAACCTATCCAACC CCTGC GTGC GCTTACGCCAGTAATT  
CCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGCTGCTG

A21 (fd1)

TGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAAGTAGCTTGCCTACTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGCCTGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACG  
CCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTCAGGGCTTCGCGATTGGATGAACCCAGGTGGGATTAGC  
TAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGG  
GAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGCGA  
GGAGGAAAGGTGGCAGCTAATATCTGTAGCTGTACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAG  
CGCACGCAGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCTGGAAATTGCATTAAA  
ACTGTTAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT  
CTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGT  
GGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAA

Rod *Shewanella*

S1 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCACAAGGGAGTTACTNCTGAGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGCCTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACG  
CCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTCAGGGCTTCGCGATTGGATGAACCTAGGTGGGATTAGC  
TAGTTGGTGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGG  
GAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGTAG  
GGAGGAAAGGTAGCAGTTAACGCTGTGCTGTACCTACAGAAGAAGGACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAG  
CGTGCAGCGGTTGTTAACGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTGCA  
ACTGGCGAACTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCATGCACGAAAGCG  
TGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTGG  
TGTCTGAACACTGGCTCTCAAGCTAACGCTTAAGTAGACCGCCTGG

S1 (1392)

CGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGAGCTT  
TGTGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGCAACCTCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTAGCC  
CTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGCCCCACCTCCTCCGGTTATCACCGGCAGTCTC  
CCTAGAGTCCCACCATACGTGCTGGCAAATAAGGATAGGGTTGCCTCGTGCAGGGACTTAAC  
CCAACATTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTCCCGAAGGCACA  
ACCGCATCTCTGCAGTCTCCGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTGCATCGAATTAA

ACCACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGTACT  
CCCCAGGC GGCTACTTAATGCGTAGCTGAGAGGCCAGTGTCAAGACACCAAACCTCGAGTAG  
ACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCACGCTTCGTGCATGAG  
CGTCAGTCTTGTCCAGGGGCCCTGCCACCGTATTCCCTCAGATCTACGCATTACCG  
CTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTCGCCAGTCGAAATGCTATTCTAGGT  
TGAGCCCAGGGCTTCACATCTCGCTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCCG  
ATTAACGCTCGGACCCCTCGTATTACCGCGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG

S2 (fd1)

GCAAGTCGAGCGGCAGCACAAGGGAGTTACTTCTGAGGTGGCGAGCGGCCGACGGGTGAGTAAT  
GCCTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCT  
ACGGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTCCCGATTGGATGAACCTAGGTGGATTAGCTAGT  
TGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGATCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTG  
GGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGGGAAA  
CCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTGGTTGAAAGCACTTCAGTAGGGAG  
GAAAGGGTGTANNTAATACGNTATATCTGTGACGTTACCTACAGAAGAAGGACCGGCTAATCCG  
TGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAGCGTGC  
GCAGGCGGTTGTTAACCGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTGAACTGG  
CGAACTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG  
AGGAATACCGGTGGCGAAGGC GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTATGCACGAAAGCGTGGG  
AGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGAAACGATGTCTACTCGGAGT

S3 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCACAAGGGAGTTACTTCTGAGGTGGCGAGCGGCCGACGGGTGAGT  
AATGCCCTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACG  
CCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTCCCGATTGGATGAACCTAGGTGGATTAGC  
TAGTTGGT GAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGATCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATCAGCCAC  
ACTGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGGG  
GAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTGGTTGAAAGCACTTCAGTAG  
GGAGGAAAGGTAGCAGTTAACNCTGTTGACGTTACCTACAGAAGAAGGACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAG  
CGTGCAGGCCGGTTGTTAACCGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTGAA  
ACTGGCGAACTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGC GGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTATGCACGAAAGCG  
TGGGGAGCAAACA

S4 (fd1)

AAGTCGAGCGGCAGCACAAGGGAGTTACTTCTGAGGTGGCGAGCGGCCGACGGGTGAGTAATGC  
CTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGCATACGCCCTAC  
GGGGAAAGGAGGGACCTCGGGCCTCCCGATTGGATGAACCTAGGTGGATTAGCTAGTTG

GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGTCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATGCCACACTGGG  
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGAAACC  
CTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGTAGGGAGGA  
AAGGGTGTARNTTAATACGNTATATCTGTGACGTTACCTACAGAAGAAGGACCGGCTAACCTCGTG  
CCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAGCGTGC  
AGCGGTTGTTAACGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTGAACTGGC  
AACTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG

S5 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCACAAGGGAGTTACTTCTGAGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGCCTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTGGAAACGACTGCTAACCGCATACG  
CCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTTCGGCCTCCCGATTGGATGAACCTAGGTGGGATTAGC  
TAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGTCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGG  
GAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGTAG  
GGAGGAAAGGTTGAGTTAACGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTG  
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAG  
CGTGCAGGCAGGCGTTGTTAACGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTG  
ACTGGCGAACTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TCTGGAGGAATACCGGTGGCGAA

S6 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCACAAGGGAGTTACTTCTGAGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGCCTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTGGAAACGACTGCTAACCGCATACG  
CCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTTCGGCCTCCCGATTGGATGAACCTAGGTGGGATTAGC  
TAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGTCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGG  
GAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGTAG  
GGAGGAAAGGTTGAGCTTAATACNCTGTTGCTGTGACGTTACCTACAGAAGAAGGACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAACCGAATTACTGGCGTAAAG  
CGTGCAGGCAGGCGTTGTTAACGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTG  
ACTGGCGAACTAGAGTCTGTAGAGGGGGTAGAATTCC

S7 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGCAGCACAAGGGAGTTACTCCTGAGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGCCTAGGGATCTGCCAGTCGAGGGGATAACAGTGGAAACGACTGCTAACCGCATACG  
CCCTACGGGGAAAGGAGGGACCTTCGGCCTCCCGATTGGATGAACCTAGGTGGGATTAGC  
TAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCAGCAGTCCCTAGCTGTTCTGAGAGGATGATGCCAC  
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGG  
GAAACCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTCAGTAG

GGAGGAAAGGGTAGTTAACGCTATCTGTACGTTACCTACAGAAGAAGGACCGGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCCGAGCGTTAACGGATTACTGGCGTAAAG  
CGTGCAGGCAGGTTGTTAACGAGATGTGAAAGCCCTGGCTAACCTAGGAATAGCATTCGA  
ACTGGCGAACTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCAGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCATGCACGAAAGCG  
TGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCGTGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTCGGAGTTGG  
TGTCTGAACACTGGCTCTCAAGCTAACGATTAAGTAGACCGCCTGG

S7 (1392)

CGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGAGCTT  
TGTGAGATTAGCTCACCTCGCGCTTGCAACCCCTGTACTCGCCATTGTAGCACGTGTAGCC  
CTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGCCCCACCTCCTCCGGTTATCACCGGCAGTCTC  
CCTAGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAAATAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGACTTAAC  
CCAACATTCAACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACNGTCCGAAGGCACN  
ANCNNATCTCTNNNNNTCNNTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTGCATCGAATT  
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTTGCAGGCGCTAC  
TCCCCAGGGCGTCACTTAATGCGTTAGCTGAGAGGCCAGTGTCAAGACACCAAACCCGAGTA  
GACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACCTGTTGCTCCCCACGCTTCGTGCATGA  
GCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTTACGCATTCA  
GCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGTCGCCAGTCGAAATGCTATTCTAGG  
TTGAGCCCAGGGTTTCACATCTCGTTAACAAACCGCCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCCG  
ATTAACGCTCGGACCCCTCCGTATTACCGCG

S13 (fd1)

GCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAAGGGAGCTGCTCCGGATGTTAGCGCGGAC  
GGGTGAGTAACACGTGGTAACCTGCTGTAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAATA  
CCGGATAGTTCTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTCGGCTGTCACTACAGATGG  
ACCCGCGGCATTAGCTAGTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTG  
AGAGGGTATCGGCCACACTGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATCTCCGAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCG  
TAAAGCTCTGTTAGGAAAGAACAAAGTGCAGAGTAACGCTCGCACCTGACGGTACCTAAC  
AGAAAGCCACGGCTAAACTACGTGCCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA  
ATTATTGGCGTAAAGGGCTCGCAGGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCG  
GGGAGGGTATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA

Rod *Serratia*

Sr1 (1392)

TACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGNCGAGTTGCAGACTCCGATCCGACTACGACGTAC  
TTTATGAGGTCCGCTGGCTCGCGAGTTGCTCTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTAG

CCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTACCCCCACCTCCTCCGGTTATCACCGGCAGTC  
TCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGGACTTA  
ACCCAACATTCACAACACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCCGAAGGCA  
CTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTTGCATCGAATT  
AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGTA  
CTCCCCAGGCAGGTGACTTAACCGTGTAGCTCCGGAAGCCACGCCCAAGGGCACAACCTCCAAGT  
CGACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGACCTG  
AGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTACGCATTCAC  
CGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTCCAC  
GTTAAGCGCGGGGATTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATT  
CGATTAACGCGTGCACCTCCGTATTACCGCGCTGCTG

Sr1 (1392)

ATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGNCAGTTGACAGACTCCGATCCGGACTACGACGTACTTTA  
TGAGGTCCGCTGGCTCTCGCGAGTTGCTCTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCT  
ACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTACCCCCACCTCCTCCGGTTATCACCGGCAGTCTCCT  
TTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGGACTTAACCC  
AACATTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCGAAGGCACAA  
GCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTTGCATCGAATTAAAC  
CACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGTACTCC  
CCAGGCAGGTGACTTAACCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGAC  
ATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGACCTGAGCG  
TCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTACGCATTCACCGCT  
ACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTCCACGTTA  
AGCGCGGGGATTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCC

Sr2 (1392)

TACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGACAGACTCCGATCCGGACTACGACGTAC  
TTTATGAGGTCCGCTGGCTCTCGCGAGTTGCTCTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTAG  
CCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTACCCCCACCTCCTCCGGTTATCACCGGCAGTC  
TCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGGACTTA  
ACCCAACATTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCGAAGGCA  
CTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTTGCATCGAATT  
AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGT  
CTCCCCAGGCAGGTGACTTAACCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCAAGGGCACAACCTCCAAGT  
CGACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGACCTG  
AGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTACGCATTCAC  
CGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTCCAC  
GTTAAGCGCGGGGATTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATT

Sr2 (1392)

GATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGNCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGTACTT  
ATGAGGTCCGCTGGCTCTCGCGAGTCGCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGAGCCC  
TACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCCGTTATCACCAGGACTCTCC  
TTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC  
CAACATTCACAACACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCGAAGGCACTA  
AGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTTGCATCGAATTAA  
ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGTACT  
CCCCAGGCCTCGACTTAACCGTTAGCTCCGGAAGGCCACGCCTCAAGGGACAACCTCCAAGTCG  
ACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTGCACCTGAG  
CGTCAGTCTTGTCCAGGGGCCCTGCCACCGTATTCCCTCAGATCTCTACGCATTACCG  
CTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTTCCACGT  
TAAGCGCGGGATTTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATTCCG  
ATTAACGCTTGCACC

Sr3 (1392)

CTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGTA  
CTTATGAGGTCCGCTGGCTCTCGCGAGTCGCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTA  
GCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCCGTTATCACCAGGACT  
CTCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT  
AACCCAAACATTCAACACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCGAAGGC  
ACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTTGCATCGAAT  
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGT  
ACTCCCCAGGCCTCGACTTAACCGTTAGCTCCGGAAGGCCACGCCTCAAGGGACAACCTCCAAG  
TCGACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTGCACCT  
GAGCGTCAGTCTTGTCCAGGGGCCCTGCCACCGTATTCCCTCAGATCTCTACGCATTCA  
CCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTTCCA  
CGTTAAGCGCGGGATTTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATT  
CCGATTAACGCTTGC

Sr3 (1392)

CGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGTACTTATGAGGTCCGCTGGCTCTCGCGAGTTCGC  
TTCTCTTGATACGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT  
CATCCCCACCTTCCCGTTATCAGGGCAGTCTCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAA  
CAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCAACATTCAACACAGAGCTGACGACA  
GCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCGAAGGCACAAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGT  
CAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGTACTCCCCAGGGCGTCACTTAACGCGTTAGC  
TCCGGAAGGCCACGCCTCAAGGGACAACCTCCAAGTCGACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGG  
TATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTGCACCTGAGCGTCAGTCTTGTCCAGGGGCCCTT

CGCCACCGGTATTCCCTCCAGATCTACGCATTTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTAC  
AAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTCCCACGTTAACGCGGGGATTTCACATCTGACTTA  
ACAAACGCCCTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTG

Sr4 (1392)

TACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGTAC  
TTATGAGGTCCGCTTGCCTTCGAGGTTCGCTCTCTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAG  
CCCTACTCGTAAGGCCATGATGACTTGACGTACATCCCCACCTCCTCCAGTTATCACTGGCAGTC  
TCCTTGAGTTCCCGCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCCTCGTTGCGGGACTAA  
CCCAACATTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCGAAGGCAC  
CAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCTGCGTTGCATCGAATT  
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTTGCACCGTAC  
TCCCCAGGCCGTCGATTAACCGTTAGCTCCGGAAGGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATC  
GACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGACCTGA  
GCGTCAGTCTCGTCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTACGCATTCACC  
GCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTACGAGACTCTAGTCTGCCAGTTCAAATGCAGTTCCAAG  
TTAAGCTCGGGGATTTCACATCTGACTTAACAAACGCCCTGCGCTTACGCCAGTAATTCCG  
ATTAACGCTTG

Sr5 (1392)

TACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCAGTTGCAGACTCCAATCCGACTACGACGTAC  
TTATGAGGTCCGCTTGCCTTCGAGGTTCGCTCTCTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAG  
CCCTACTCGTAAGGCCATGATGACTTGACGTACATCCCCACCTCCTCCAGTTATCACTGGCAGTC  
TCCTTGAGTTCCCGCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCCTCGTTGCGGGACTAA  
CCCAACATTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCGAAGGCAC  
CAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCTGCGTTGCATCGAATT  
AACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTTGCACCGTAC  
TCCCCAGGCCGTCGATTAACCGTTAGCTCCGGAAGGCCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAATC  
GACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGACCTGA  
GCGTCAGTCTCGTCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTACGCATTCACC  
GCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTACGAGACTCTAGTCTGCCAGTTCAAATGCAGTTCCAAG  
TTAAGCTCGGGGATTTCACATCTGACTTAACAAACGCCCTGCGCTTACGCCAGTAATTCCG  
ATTAACGCTTG

Sr5 (1392)

CATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCAGTTGCAGACTCCAATCCGACT  
ACGACGTACTTATGAGGTCCGCTTGCCTTCGAGGTTCGCTCTCTTGTATACGCCATTGTAGCA  
CGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGCCATGATGACTTGACGTACATCCCCACCTCCTCCAGTTATCA  
CTGGCAGTCTCCTTGAGTTCCCGCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCCTCGTTGC  
GGGACTTAACCAACATTCAACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCC  
CGAAGGCACCAAGCATCTGCTAAGTTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCTTGC

CATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTT  
GCGGCCGTACTCCCCAGGC GGTCGATTAACGC GTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAA  
CCTCAAATCGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTT  
TCGCACCTGAGCGTCAGTCTCGTCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTAC  
GCATTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACGAGACTCTAGTCTGCCAGTTCAAATGC  
AGTCCCAGTTAACGCTCGGGATTTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCC  
AGTAATT

Sr7 (1392)

CGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGTACTTATGAGGTCCGCTGGCTCGAGTTCGC  
TTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGT  
CATCCCCACCTCCTCCGGTTATCACCGCAGTCTCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAA  
CAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGACTTAACCCAACATTACAACACGAGCTGACGACA  
GCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCCAGGC ACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTGGATGT  
CAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGTACTCCCCAGGGCGTCACTAACGCGTTAGC  
TCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGACAACCTCCAAGTCGACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGG  
TATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCGCTT  
CGCCACCGTATTCCCTCAGATCTCTACGCATTCAACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTAC  
AAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTTCCCACGTTAACGCGGGGATTTCACATCTGACTTA  
ACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATTCCGATTA

Sr8 (1392)

CTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGTA  
CTTATGAGGTCCGCTGGCTCGCGAGTTCGCTTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGA  
GCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCACTCCACCTCCTCCGGTTATCACCGGCAGT  
CTCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGGACTT  
AACCCAACATTCAACACCGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCCAGAGC  
ACTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTGCATCGAAT  
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGT  
ACTCCCCAGGC GGTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGACAACCTCCAAG  
TCGACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGCACCT  
GAGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCCTCAGATCTCTACGCATTCA  
CCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTTCCA  
CGTTAACGCGGGGATTTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCCTTACGCCAGTAATT  
CCGATTACGCTTG

Sr8 (1392)

TACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGNCAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGTA  
TTTATGAGGTCCGCTGGCTCGCGAGTTCGCTTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTAG

CCCTACTCGTAAGGCCATGATGACTTGACGTACCCCCACCTCCTCCGGTTATCACCGGCAGTC  
TCCTTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTGCCTCGTGCAGGGACTTA  
ACCCAACATTCACAACACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCAGAGTCCGAAGGCA  
CTAAGCTATCTCTAGCGAATTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTCGCGTGCATCGAATT  
AAACCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCCGTCAATTGAGTTAACCTGCGGCCGTA  
CTCCCCAGGCAGGTGACTTAACCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCCAAGGGACAACCTCCAAGT  
CGACATCGTTACAGCGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGACCTG  
AGCGTCAGTCTTGCCAGGGGCCCTCGCCACCGGTATTCCAGATCTACGCATTCAC  
CGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTACAAGACTCTAGCTGCCAGTTCAAATGCAGTCCAC  
GTTAAGCGCGGGATTTCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGCTTACGCCAGTAATT  
CGATTAACGCTGCACCTCCGTATTACCG

Sr9 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAAGAGAGCTTGCTCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGT  
AATGTCTGGAAACTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAAC  
GTCTTCGGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCT  
AGTAGGTGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCAC  
ACTGGAACTGAGACACGGTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGACAATGGC  
GCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCCTGGGTTGAAAGCAGTTCAGCGA  
GGAGGAAGGGNAGTGTGTTAATAGCACATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCAGCCGCTAA  
CTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAAAG  
CGCACGCAGCGGTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCCGCTTAACGTGGGAACTGCATTGAA  
ACTGGCAAGCTAGAGTCTTAGAGGGGGTAGAATTCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA  
TCTGGAGGAATACCGTGGCGAAGGCCGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCG  
TGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCGTGTAGCCACGCTGAAACGATGCGACTTGGAGGTTGT  
GCCCTGAGCGTGGCTCCGGAGCTAACCGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGAGTAC

Rod *Bacillus* sk. D

Bd1 (fd1)

TAAGAGCTGCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCCATAAG  
ACTGGATAACTCCGGAAACCGGGCTAATACCGATAATATTGAACTGCATAGTCGAAATT  
GAAAGCGGCTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCCGC

Bd5 (fd1)

TGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCGGACG  
GGTAGAGTAACACGTGGTAACCTGCCATAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGGCTAATAC  
CGGATAATATTGAACTGCATGGTCGAAATTGAAAGCGGCTCGGCTGTCACCTATGGATGGA  
CCCGCGTCGCACTAGCTAGTTGGTGAGGTACCGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA  
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGA  
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGAAGGCTTCGGGCGT

AAAACCTGTTAGGGAAAGAACAAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTGACGGTACCTAACCG  
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA  
ATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTAACCG  
TGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCATGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTTCTGGTCTGTAACTGACA  
CTGAGGCGCAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGAAACGAT  
GAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG  
G

Bd5 (1392)

AGCGAGTTGCAGCCTACAATCGAACTGAGAACGGTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCT  
TGCAGCTTTGTACCGTCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGTATAAGGGCATGATGATTG  
ACGTCATCCCCACCTCCTCCGGTTGTCACCGCAGTCACCTAGAGTGCCAACTTAATGATGGC  
AACTAAGATCAAGGGTGCCTCGTTGCGGGACTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC  
AACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCGAAGGAGAACCCATCTAGGGTTTCAGAGGATG  
TCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC  
CCCGTCAATTCCCTTGAGTTTCAGCCTGCGCCGTAECTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAAC  
TTCAGCACTAAAGGGCGAACCCCTCTAACACTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGG  
GTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTCGCGCCTCAGTGTCACTACAGACCAGAAAGTCGCC  
TCGCCACTGGTGTCCATATCTACGCATTACCGCTACACATGGAATTCCACTTCCTCTTC  
TGCACTCAAGTCTCCAGTTCCAATGACCTCACGGTTGAGCCGTGGCTTCACATCAGACTTA  
AGAAACCACCTGCGCGCTTACGCCAATAATT

*Oerskovia Oe* (fd1)

ACATGCAAGTCGAACGGTATGCCAGCTGCTGGCGGATCAGGGCGAACGGGTGAGTAACAC  
GTGAGTAACCTGCCAGACTCCGGATAAGCCTGGAAACGAGGTCTAATACTGGATACGAGAC  
GCCCTGCATGGGAGTGTCTGGAAAGATTATCGGTCTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTG  
TTGGTGGGTAATGCCATACCAAGGCGACGACGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACAC  
TGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAATTGCACAATGGCGA  
AAGCCTGATGCAGCGACGCCGTGAGGGATGAAGGCCTCGGGTTGAAACCTTTACAGCAGGG  
AAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGAGAAGAGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGTA  
ATACGTAGGGCGCAAGCGTTGCTCGGAATTATTGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGTTGCGGT  
CTGGTGTGAAAACCTCAAGGCTAACCTTGAGCTGCATCGGTACGGCAGACTAGAGTGCCTG  
GGGTGACTGGAATTCTGGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAA  
GGCAGGTCACTGGCCGCAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGCACTAGGTGTGGGCTATTCCACGAGTTCCGTGCC  
CAGCAAACGCATTAAGTGCC

Oe (1392)

GTTGCTGATCTCGGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAC  
TGAGACC GGCTTTGGGATT CGCTCCACCTCGCGGTATCGCAGCCCTTGTACCGGCCATTGTAGC  
ATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGGGCATGATGATTGACGTATCCCCACCTCCTCCGAGTTGA  
CCCCGGCAGTCTCTTATGAGTCCCCACCATGACGTGCTGGCAACATAAGACGAGGGTTGCGCTCGT  
TGGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCGAC  
CTTGC GGGCAACCATCTCTGGAAAGTTCCGGTGTATGTCAAGCCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGC  
ATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTGTAGTTAGCCTTG  
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGGCACTTAATGC GTTGCTGCCAACGGAACTCGTGGAAATGAGGCC  
CACACCTAGTGCCAACGTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCATGCT  
TTCGCTCCTCAGCGTCAGTGCGGCCAGTGACCTGCCATCGGTGTTCTCGTGTATCTG  
CGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCACCCCTACCGCACTTAGTCTGCCGTACCCGATG  
CAAGCTCAAGGTTGAGCCTTGAGTTTACACCAGACGCGACAAACGCC TACGAGCTTTACGC  
CCAATAATTCCGGACAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGTGTGGCACGTAGTTAGCCG

*Achromobacter Ah1* (fd1)

CCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAG  
TAATGTATCGGAACGTGCCTAGTAGCGGGGGATAACTACCGAAGACGTAGCTAATACCGCATA  
GCCCTACGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTGCACTATTAGAGCGGCCGATATCGGATTAG  
CTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCAGCGATCCGTAGCTGGTTGAGAGGACGACCAGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGGACAATGG  
GGGAAACCCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCACTTTGGC  
AGGAAAGAAACGT CATGGGCTAATACCCGTGAAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACC GGCT  
AACTACGTGCCAGCGCCGGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAA  
AGCGTGCAGCGCCGGTCTGGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGAGCTTAACCTTGGAACTGCATT  
TAAC TACCGAGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTGGAATTCCCGCGTGTAGCAGTGAAATGCGT  
TATCGGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCTCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAG  
CGTGGGAGCAAACAGG

Ah2 (fd1)

GCCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAG  
GTAATGTATCGGAACGTGCCTAGTAGCGGGGGATAACTACCGAAGACGTAGCTAATACCGCATA  
GCCCTACGGGGAAAGCAGGGGATCGCAAGACCTGCACTATTAGAGCGGCCGATATCGGATTAG  
GCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCAGCGATCCGTAGCTGGTTGAGAGGACGACCAGC  
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGGACAATGG  
GGGAAACCCCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCTCGGGTTGAAAGCACTTTGG  
CAGGAAAGAAACGT CATGGGCTAATACCCGTGAAACTGACGGTACCTGCAGAATAAGCACC GGCT  
AACTACGTGCCAGCGCCGGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGCGTAA  
AGCGTGCAGCGCCGGTCTGGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGAGCTTAACCTTGGAACTGCATT  
TAAC TACCGAGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTGGAATTCCCGCGTGTAGCAGTGAAA

*Ochrobacter* Oh1 (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGGAATCTACCTT  
TTGCTACGAAACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGTATGTGCCCTCGGGGGAAAGATTAT  
CGGCAAAGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTAGAGTAAAGGCTACCAAGGCGACGAT  
CCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGTGAGTGATG  
AAGGCCCTAGGGTTGAAAGCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGAACCGGAGAAGAACCCC  
CGGCTAACTCGTGCCAGCAGCCCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGGATTTACTGGC  
GTAAAGCGCACGTAGGCGGATTTAAGTCAGGGTGAAATCCGGGCTCAACCCCGGAACACTGC  
CTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGGATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTG  
TAGATATTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGACCATTACTGACGCTGAGGTGCG  
AAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGC  
CGTCGGGAGTTACTCTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGGAGTACGGTC  
GCAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGG

Oh2 (fd1)

GNNNGCTAAACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACCGTGGG  
AATCTACCTTGCTACGAAACAACAGTTGAAACGACTGCTAATACCGTATGTGCCCTCGGGGG  
AAAGATTATCGGCAAAGGATGAGCCCGCTGGATTAGCTAGTTGGTAGAGTAAAGGCTACCA  
AGGCAGCATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA  
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGC  
GTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGAAAGCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGTAACCGGA  
GAAGAAGCCCCGGCTAACCTCGTGCAGCAGCCCGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGTCGG  
ATTTACTGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATTTAAGTCAGGGTGAAATCCGGGCTCAACC  
CCGGAACACTGCCTTGATACTGGAAGTCTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGGATTCCGAGTGTAGAG  
GTGAAATTCTGTAGATAATCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTACTGGACCATTACTGACG  
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT  
GAATGTTAGCCGTGGGGAGTTACTCTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAACATTCCGCCTGGG  
GAGTACGGTCGCAAGATTAACACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATG  
TGGTTAATCGAACGCAACCGCAGAACCTTACCAAGCCCTGACATACCGGTCGGACACAGAGA  
TGTGTCTTCAGTCGGCTGGN

Oh2 (1392)

CGGCATGCTGANCCGCGNTTACTAGCGATTCCAACCTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCAATCCG  
AACTGAGATGGCTTGAGATTAGCTCACACTCGCGTGTGCTGCCACTGTCACCACCAATTGTA  
GCACGTGTGTAGCCAGCCGTAAAGGCCATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTCCTCCAGCTT  
ATCACTGGCAGTCCCTTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAAAGGCGAGGGTTGCGCTCGT  
TGCAGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATCCGGTC  
CAGCCGAACGTAAAGACACATCTGTGTCCCGACCGGTATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCG  
CGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTGAGTTTA

ATCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGAATGTTAATGCGTTAGCTGCCACCGAACAGAGTAAACTC  
CCCGACGGCTAACATTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACCTGTTGCTCCCCAC  
GCTTCGCACCTCAGCGTCAGTAATGGTCCAGTGAGCCGCCACTGGTGTCCCTCGAATAT  
CTACGAATTTCACCTCTACACTCGAATTCCACTCACCTCTACCATACTCAAGACTTCAGTATCAA  
AGGCAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGGGATTTCACCCCTGACTAAAAATCCGCCACGTGCGCTTA  
CGCCCAGTAAATCCGAACAAACGCTAGCCCCCTCGTATTACCGCGCTGCTGGCACGAAGTTAGCC  
CGGGCTTCTTCNCGGTTACCGTCATTATCTTACCGGTGAAAGA

*Paenibacillus* Pa (fd1)

GCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACNTGATGGAGTGCTGCACCTGANGGTTAGCGGCGGAC  
GGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTCAAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATA  
CCGGATAATTATTTCAGCATTGTGAAATAATGAAAGGCGGAGCAATCTGTCACTTGAGGATGG  
GCCTGCGGCCGCTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCT  
GAGAGGGTGAACGCCACACTGGACTGAGACACGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG  
GAATCTTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTAGTGATGAAGGTTTCGGAT  
CGTAAAGCTCTGGCCAAGGAAGAACGTCTTAGAGTAACGTAGTAGGAGAGTGACGGTACTTGA  
GAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCGCCAGCGGTAAACGTAGGGGCAAGCGTTGTCG  
GAATTATTGGCGTAAAGCGCGCAGCGGTTCTTAAGTCTGGTAAACCGAGGCTAAC  
TTCGGGTCCGACTGAAACTGGGNACTTGAGTGAGAAGAGGAGGTGAATTCCACGTGTAGC  
GGTGAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCAAGGCAGCTCTGGCTGTAACTGAC  
GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA  
TGAATGCTAGGTGTTAGGGT

Pa (1392)

GCGGCATGCTGATCCCGATTACTAGCAATTCCGACTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCC  
GAAC TGAGACTGGCTTTATAGGATTGGCTCCACCTCGGGCTTCGCTTCCGGTTGTACCA  
GTAGTACGTGTAGCCAAAGTCATAAGGGCATGATGATTGACGTACATCCCGCCTCCGG  
TTTGTACCGGCAGTCATTCTAGAGTGCCACCCAAAGTGCTGGCAACTAAAATCAAGGGTTGCG  
TCGTTGCGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCA  
TCTGTCCCGAAGGCCGCTCTATCTAGAGGATTAGGGATGTCAAGACTGGTAAGGTTCTT  
CGCGTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGTGTTACTCGGACCAAGGGTATCGA  
AACCCCTAACACCTAGCATTGATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAC  
CCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGAGTCGCCACTGGTGTCC  
ATATCTACGCATTACCGCTACACGTGGAA

*Staphylococcus* St1 (fd1)

NGNGGCGTGCCTAACATGCAAGTCGAGCGAACAGATAAGGAGCTGCTCCTTGAAGTTAGCG  
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTCGGGAAACCGGAG  
CTAATACCGATAACATTAGAACCGCATGGTCTAAAGTGAAGAGATGGTTGCTATCACTTATA

GATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAGACGATACGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGAAATCTCCGCAATGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGTGAAAGGGTTTC  
GGCTCGTAAAACCTCTGTTATTAGGAAAGAACAAATGTGTAAGTAACGTGACATCTGACGGTAC  
CTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTA  
TCCGGAATTATTGGCGTAAAGCGCGTAGGCGTTCTTAAGTGTGAAAGGCCACGGCT  
CAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCCATGT  
GTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAA  
CTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTA  
AACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTCCGCCCTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC  
CGCCTGGGGAGTACGACCGCNGG

St1 (1392)

GTNNATGCTGANCTACGATTACTAGCGATTCCAGCTCATGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCG  
AACTGAGAACAACTTATGGGATTGCATGACCTCGCGTTAGCTGCCCTTGTATTGTCCATTGT  
AGCACGTGTAGCCAAATCATAAGGGCATGATGATTGACGTACATCCCCACCTCCCTCCGGTT  
GTCACCGGCAGTCACCTAGAGTGCCAACTTAATGATGGCAACTAAGCTTAAGGGTTGCGCTCGT  
TGCAGGACTTAACCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCAGTGCACCACCTGTCACTTGT  
CCCCCGAAGGGAAAGGCTCTATCTCTAGAGTTCAAAGGATGTCAAGATTGGTAAGGTTCTCG  
CGTTGCTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCTTGAGTTCA  
ACCTTGCAGGTCGTAACCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCCTAGCTGCAGCACTAACGGGCGGAAAC  
CCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAACCTGTTGATCCCC  
ACGCTTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTCGCCACTGGTGTCCCTCCATAT  
CTCTGCGCATTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTCCTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTCC  
AATGACCCCTCACGGTGAGCCGTGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTACGCGCGCTT  
ACGCCAATAATTCCGGATAACGCTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGN  
CGTGGCTTCTG

*Acinetobacter* Ac (fd1)

CATGCAAGTCGAGCGGGAAAGGTAGCTGCTACCTGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCT  
TAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGACAACATCTGAAAGGGATGCTAACACGCATACGTCTACG  
GGAGAAAGCAGGGACCTCGGGCCTGCGCTAACAGGCTAACAGGCGACGATCTGAGCGGCTGAGAGGATGATCCGCCACTGGGA  
GGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGAGCGGCTGAGAGGATGATCCGCCACTGGGA  
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTGGACAATGGGGGAACCC  
TGATCCAGCCATGCCCGTGTGAAGAAGGCCTTGGTAAAGCACTTAAGCGAGGAGGAG  
GCTACCGAGATTAATACTCTGGATAGTGGACGTTACTCGC

*Bacillus* skupine a Ba1 (fd1)

CCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAACAGGAGCTTGCCTCCGGATGTTAGCGGCGGACGGGTG  
AGTAACACGTGGTAACCTGCCGTAAAGACTGGATAACTCCGGAAACCGGAGCTAACACCGGA

TAGTCCTGAACCGCATGGTCAAGGATGAAAGACGGTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCG  
CGCGCATTAGCTAGTTGGGGTAATGGCTACCAAGGCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG  
GGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC  
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGTGAGTGATGAAGGTTTCGGATCGTAA  
AGCTCTGTTAGGGAAAGAACAAAGTGCAGAGACTGCTCGCACCTGACGGTACCTAACAGA  
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGCCATT  
ATTGGCGTAAAGGGCTGCAGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTAACCGGGG  
AGGGTCATTGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGATTCCACGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCAAGGCGACTCTGGTCTG

*Alcaligenes* Al1 (fd1)

GCTTACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGAGAGAGCTGCTCTTGGCGCGAGTGGCGGAC  
GGGTGAGTAATATCGAACGTGCCAGTAGCGGGGGATAACTACTCGAAAGAGTGGCTAATAC  
CGCATA CGCCCTACGGGGAAAGGGGGGATCGCAAGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATC  
GGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCTACCAAGGCAACGATCCGTAGCTGGTTGAGAGGACG  
ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATTTGG  
ACAATGGGGAAACCTGATCCAGCCATCCCGCGTGTATGATGAAGGCCTCGGGTTGTAAAGTAC  
TTTGGCAGAGAAGAAAAGGTATCTCTTAATACGAGATACTGCTGACGGTATCTGCAGAATAAGCA  
CCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTCAAGCGTTAACGGAATTACTGGG  
CGTAAAGCGTGTGTAGCGGTTGGAAAGAAAGATGTGAAATCCAGGGCTAACCTGGAACTG  
CATTTTAACTGCCGAGCTAGAGTATGTCAGAGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAGTGAAATGC  
GTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAA

## PRILOGA B

Sekvence pomnoženih delov genov qnr

A4 (qnrB R)

GGCTTCTCGACTACTGCCTCTCGGTCGAATGCTGGCGCATCGCCAATGCGCTGCTCGAAA  
GTCCGACGAAACTCAGAGGACGCCCTCTCAGATTCTCACTGAGACGAATACTCAATTCTTGGTC  
GTGAGTGGATACCGTGCGTAACGAGATTGCAACGCTGCCCTATCACCAACATCAAATCCGCA  
CGCTCTCCAGTGGCGAATTCNATNCCA

S2 (qnrB R)

CGATGGGATAAACCAACACGCCAACATGGCCTGCGCTTTCTGGCATTACTCACGCCGCA  
AGCTCGGCGGGTAACATGACG

A1 (qnrS F)

GTCTCCTCTTGATGGATCATTGTCCTAACAGGGTGAATGGCTGGCAAGCGGGTGAGCTTATTCC  
TAATCGTTATTGCACTGCGAACAGTTCTCATTAGATTTCATCTCAATCCAGCATGAGGTAGAAAT  
TATGTACGTGTGTTGTGCCGCGCATCACAGATAACCAGATCCGCAAGGCAGGTACAGGCAGGCAA  
GACCGAGTTCCGGCAACTGAAACAGTCGCTGGAAGTGGGTGCCAGTGCAGCAAGTGTACGCA  
TGACCATGGAGATCATGCCGCCGAACCTCGACGGTTA

## PRILOGA C

Sekvence pomnoženih delov genov z primerji SHV

S2,1 (SHV F)

NTNTTGACAATNAGGTGGNATTNGNNCTGGGGCTGCNGCTGGGTTAGGTGAGNGTATGCCATCAT  
GTTGGCTGAACGAGGGCAAAANTGNTACTCGNCACCNNGCGTTATCGTCCTATGAGTNAATTN  
CANCNCNCGCTCGGACGAGCCAAGCCAANTTANAATTAAATGCAGACCTATTGNAGCATTATTA  
AACTCGGTGGAGATTGCATTATTNTNGNGCTTGATGTGAGTCAGCGAAATGAANNAACAGCATGA  
TCGAAGAGGTGATCCTACGCTGGNNTNGCATTGATATCTNGATTAATAACCGCGGCNTNNATNGNG  
CTTNNNCCTNTGAACACATTAAANTGANCACTGGNAACGCTAAA

S12 (SHV F)

NCNTGCNAGGGTGTANTAGTNGTTANTANTGGCCTGGCTCAGCGGGNGGATGTCCNTCAANTNGTC  
CCANNGCGTNNCNNNTGCCNNCCNAAANCNNGANNCCNGTCTCNAGCCGGTNCNGAATCANAAGC  
AGAANCNATTGCNNNGNGNNNGTGTNCNTCATCNTGNNANNANTNCNATGAATAACANCAAANA  
NANCAAGCNNCCNGNGCCNGAGNTCCGTGNNATAATCCTGANGAGGAACTGGCNTNTNCAGGGG  
GNTGGNNAATCANNGAANAGGCNNTGGCTTGAAAGACNNAGANATTGCNCGCCNTGGTAA  
AGGAAANTT

**PRILOGA D**

Minimalne inhibitorne koncentracije za moksifloksacin

Sev	MIC moksifloksacin [µg/ml]
A1	1,0
A2	0,19
A3	0,94
A4	1,5
A5	0,047
A6	0,125
A7	0,047
A8	0,023
A9	0,094
A10	0,032
A11	2,0
A12	0,064
A13	0,19
A14	0,25
A15	0,125
A16	0,047
A17	0,38
A18	0,125
A19	0,125
S1	0,038
S2	0,125
S3	0,064
S4	0,064
S5	0,064
S6	0,064
S7	0,032
S8	0,50
S9	1,0
S10	1,0
S12	0,094
S13	0,094
S14	0,38
S15	0,023
Ss16	0,094
Sr2	0,50

Sev	MIC moksifloksacin [µg/ml]
Sr3	0,38
Sr4	1,5
Sr5	1,0
Sr6	1,0
Sr7	0,75
Sr8	0,38
Bd1	0,047

**PRILOGA E**

Dovoljenje za izlov človeške ribice (*Proteus anguinus*), Ministrstvo za okolje, prostor in energijo Republike Slovenije



UD. I. PREJ. BULOG  
PREJ. IVLET

22.10.04

REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA OKOLJE, PROSTOR IN ENERGIJO  
AGENCIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA OKOLJE

Vojkova 1b, 1001 Ljubljana p.p. 2608

tel.: +386(0)1 478 40 00 fax: +386(0)1 478 40 51

**BIOTEHNIŠKA FAKULTETA**

Številka: 35701- 81/2004  
Datum: 20.10.2004

Op. en.	Številka	Pri.
3	1305	

22. 10. 2004

Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Agencija Republike Slovenije za okolje, izda na podlagi drugega odstavka 12. člena uredbe o organih v sestavi ministrstev (Uradni list RS, št. 58/03, 45/04, 86/04) in prvega odstavka 7. člena uredbe o zavarovanih prostozivečih živalskih vrstah (Uradni list RS, št. 46/04, 109/04), na zahtevo stranke Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1001 Ljubljana, ki jo zastopa dekan prof. dr. Jože Resnik v upravnih zadevah izdaje dovoljenja za odvzem iz narave zavarovanih živalskih vrst, naslednje:

**D O V O L J E N J E**

- Stranki, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1001 Ljubljana, se dovoli odvzem iz narave naslednjih zavarovanih vrst živali:
  - 20 osebkov človeške ribice (*Proteus anguinus*),
  - 5 osebkov samcev potočnega raka (*Astacus astacus*),
  - do 20 osebkov samcev rakov koščakov (*Austropotamobius spp.*).

Odgovorna nosilca projekta sta prof. dr. Boris Bulog in prof. dr. Boris Sket.

2. Odvzem osebkov zavarovanih vrst iz narave se dovoli **pod pogojem**, da se:
  - odvzem človeških ribic predvidoma izvrši ob času visokih vod, ko voda iz podzemlja praviloma odplavi na površje posamezne osebke,
  - človeške ribice predvidoma odvzame na naslednjih lokacijah: Planinska jama, Kompoljska jama, Otovski breg, izvir Jelševnik, izvir Krupe in Vir pri Stični,
  - odvzem samcev rakov koščakov in samcev potočnih rakov predvidoma ne izvrši v mesecu oktobru in novembру,
  - samic rakov koščakov in potočnih rakov ne vznemirja v času od oktobra do maja,
  - samce potočnih rakov predvidoma odvzame na območju Bleda in samce rakov koščakov v porečju Krke in Kolpe,
  - za odvzem osebkov uporabljajo metode, pri katerih naj bo vznemirjanje živali v habitatu čim manjše,
  - odlovljene žive osebke, če je to možno, vrne v naravo na mestu odlova,
  - na posameznih lokacijah odvzame le po en osebek.
3. Dovoljenje velja do 31.12.2009.
4. Stranka je letno dolžna Ministrstvu za okolje, prostor in energijo, Agenciji Republike Slovenije za okolje, posredovati **poročilo**, ki mora vsebovati seznam ujetih živali, ki vključuje naslednje podatke: vrsto živali, število živali, kraj (lokacija) ujetja ali usmrtnitve živali, način ujetja, vzrok za ujetje oziroma smrt. Ob zaključku raziskav je stranka dolžna pripraviti končno poročilo o raziskavi z najpomembnejšimi ugotovitvami oziroma objave in napovedi objav v strokovnih člankih.

## O b r a z l o ž i t e v

Stranka, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Večna pot 111, 1001 Ljubljana, je zaprosila za izdajo dovoljenja za odvzem iz narave 20 osebkov človeške ribice (*Proteus anguinus*), 5 osebkov samcev potočnega raka (*Astacus astacus*) in do 20 osebkov rakov koščakov (*Austropotamobius spp.*) z vlogo z dne 07.07.2004.

Uredba o zavarovanih prosto živečih živalskih vrstah (Uradni list RS, št. 46/04, 109/04; v nadaljevanju: uredba) v 5. členu določa, da je prepovedano zavestno poškodovati, zastrupiti, usmrstiti, odvzeti iz narave, loviti, ujeti ali vznemirjati živali varovanih živalskih vrst iz poglavja A priloge 1 uredbe. Ne glede na navedeno prepoved pa lahko Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Agencija Republike Slovenije za okolje kot organ v sestavi, dovoli usmrnitev, odvzem iz narave, ujetje, vznemirjanje ali poškodovanje živali živalskih vrst iz 5. člena uredbe, če ni druge možnosti in ta ravnanja ne škodujejo ohranitvi ugodnega stanja populacije, zaradi selektivnega in omejenega ujetja ali posega, ki lahko povzroči poškodovanje ali odvzema živali za namene raziskovanja (7. člen).

Stranka bo opravljala raziskave v obdobju od leta 2004 do 2009 v okviru raziskovalnega programa Zoološke in speleobiološke raziskave. Namen raziskav je razreševanje taksonomske problematike in ugotavljanje posledic polucije na preživetje vrst.

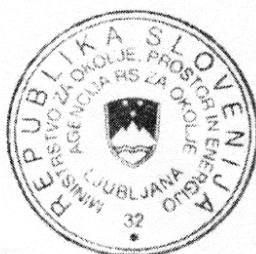
V postopku odločanja je naslovni organ upošteval strokovno mnenje, ki je podlaga za izdajo tega dovoljenja in ga je pripravil Zavod Republike Slovenije za varstvo narave, št. 8-II-518/5-O-04/ND z dne 03.09.2004. Strokovno mnenje vsebuje: oceno o vplivu odvzema iz narave, časovno obdobje in geografsko območje odvzema, sredstva oz način odvzema in ukrepe v zvezi z izvedbo nadzora, kakor je določeno v 8. členu te uredbe.

Naslovni organ je po proučitvi vloge in na podlagi strokovnega mnenja Zavoda RS za varstvo narave ugotovil, da so ob upoštevanju v izreku navedenih pogojev izpolnjeni formalni pogoji za izdajo dovoljenja za odvzem iz narave zavarovanih živalskih vrst.

**Pouk o pravnem sredstvu:** Zoper to dovoljenje je dovoljena pritožba na Ministrstvo za okolje, prostor in energijo, Dunajska 48, Ljubljana, v roku 15 dni od vročitve, ki se lahko vloži pisno ali da ustno na zapisnik pri organu, ki je izdal to dovoljenje. Pritožbo je treba kolkovati s 3.400,00 SIT upravne takse.

Pripravila:

Mateja Blažič, univ. dipl. biol.  
Svetovalka II



mag. Aleksander Golob  
Pon sekretar

Vročiti:

- Stranki s prilogom – Strokovno mnenje Zavoda RS za varstvo narave,

V vednost:

- Zavod RS za varstvo narave, Cankarjeva 10, 1000 Ljubljana;
- Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano, Dunajska 56,58, 1000 Ljubljana;
- MKGP, Inšpektorat za kmetijstvo, gozdarstvo, lovstvo in ribištvo, Parmova 33, Ljubljana;
- MOP, Inšpektorat RS za okolje in prostor, Vilharjeva 33, Ljubljana;
- Spis, tu.