

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Martin ŠTIMPFEL

**MOLEKULARNO BIOLOŠKA ANALIZA PRITRJENIH IN
PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH ZDRUŽB V LOKALNEM
VODOVODNEM SISTEMU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHARACTERIZATION OF ATTACHED AND PLANKTONIC
BACTERIAL COMMUNITIES IN LOCAL WATER DISTRIBUTION
SYSTEM BY MOLECULAR METHODS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Inštituta za fizikalno biologijo v Ljubljani.

Študijska komisija medoddelčnega dodiplomskega študija biotehnologije je na seji dne 04.06.2009 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar, za somentorja dr. Aleša Lapanje in za recenzenta prof. dr. Davida Stoparja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: dr. Aleš LAPANJE
Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o., Ljubljana

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da ja naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Martin ŠTIMPHEL

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579:621.64(043.2)=163.6
KG	mikrobiologija/bakterijske združbe/vodovodni sistemi/pitna voda/kakovost/molekularno biološke analize/Slovenija
KK	AGRIS T01
AV	ŠTIMPFEL, Martin
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/LAPANJE, Aleš (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	MOLEKULARNO BIOLOŠKA ANALIZA PRITRJENIH IN PLANKTONSKIH BAKTERIJSKIH ZDRUŽB V LOKALNEM VODOVODNEM SISTEMU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 56 str., 10 pregl., 32 sl., 7 pril., 75 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kvalitetna pitna voda je pomembna dobrina, vendar je do nje marsikdo prikrajšan zaradi onesnaževanja, neprimernega transporta vode in drugih kompleksnih dogajanj v vodovodu. Pogosta težava so nezaželeni mikroorganizmi. Za spremljanje mikrobiološkega stanja vode zakonodaja določa gojitvene tehnike, ki pa zajamejo samo majhen delež različnih vrst mikroorganizmov. V naši raziskavi smo za spremljanje strukture bakterijske združbe v vodovodnih sistemih z veliko (vodovod na Dolenjskem) in malo vnosa organskih snovi (vodovod na Gorenjskem) poleg gojitvenih tehnik uporabili molekularno tehniko temperaturne gradientne gelske elektroforeze (TGGE) za ločevanje 16S rRNA pomnoženih genov iz DNK celotne združbe vzorca. Najbolj pogostim segmentom gena za 16S rRNK smo določili nukleotidno zaporedje in na osnovi sekvenc najbolj pogoste predstavnike bakterijske združbe. Glede na pridobljene sekvene v vodovodnem sistemu na Dolenjskem prevladujejo predvsem predstavniki bakterij iz razredov <i>Gammaproteobacteria</i> , <i>Betaproteobacteria</i> in <i>Alphaproteobacteria</i> , v pritrjenih bakterijskih združbah pa tudi predstavniki debla <i>Firmicutes</i> . V vodovodnem sistemu na Gorenjskem prevladujejo predvsem predstavniki debel <i>Proteobacteria</i> , <i>Chlamydiae</i> in <i>Acidobacteria</i> . Poleg tega smo ugotovili, da se v vodovodnem sistemu na Dolenjskem planktonske in pritrjene bakterijske združbe po strukturi razlikujejo, bolj raznolike so pritrjene, saj jih sestavlja več skupin bakterij. Struktura znotraj združb se spreminja tudi z letnim časom in glede na mesto nahajanja v vodovodnem sistemu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579:621.64(043.2)=163.6
CX microbiology/bacterial communities/water distribution systems/drinking water/molecular biological analyses/Slovenia
CC AGRIS T01
AU ŠTIMPFEL, Martin
AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ LAPANJE, Aleš (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
PY 2009
TI CHARACTERIZATION OF ATTECHED AND PLANKTONIC BACTERIAL COMMUNITIES IN LOCAL WATER DISTRIBUTION SYSTEM BY MOLECULAR METHODS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XI, 56 p., 10 tab., 32 fig., 7 ann., 75 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Due to pollution, inappropriate transportation and complexity of water distribution systems, not everyone could expect safe and clean drinking water at their household. Appearance of unwanted microorganisms is often a problem. For this reason microbiological monitornig needs to be done regularly. Current tests are based on cultivation on culture media and only small population of bacteria could be detected with them, which poses a problem for accurate monitoring. In our research we used molecular biological method TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) for separation of partially amplified 16S rRNK gene. DNA samples were taken from two different water distribution systems, one is in Dolenjska and the other is in Gorenjska. When TGGE was done, we excised dominant bands on TGGE gel and sequenced them. Regarding on these sequences, major taxonomic groups, such as *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* and in sessile bacterial communities also *Firmicutes*, predominate in water distribution system in Dolenjska. In water distribution system in Gorenjska predominate major taxonomic groups such as *Proteobacteria*, *Chlamydiae* and *Acidobacteria*. We also confirmed that structure of planktonic bacterial communities is different as structure of sessile bacterial communities (sessile are more diverse). Structure also depends on season and on place where samples were taken from, because the structure on springs was different as structure on taps.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VODOVODNI SISTEM	3
2.2 MIKROBIOLOGIJA VODOVODNEGA SISTEMA	3
2.3 PRITRJENE BAKTERIJSKE ZDRUŽBE (BIOFILMI)	5
2.3.1 Biofilmi v vodovodnem sistemu	6
2.3.2 Razvoj biofilmov na različnih materialih	6
2.4 PATOGENE BAKTERIJE v vodovodnem sistemu	7
2.5 INDIKATORJI MIKROBIOLOŠKE KVALITETE PITNE VODE	8
2.5.1 Mikrobiološke preiskave	8
2.6 DEZINFEKCIJA PITNE VODE	9
2.7 METODE ZA UGOTAVLJANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB	9
2.7.1 Molekularne tehnike	10
2.7.1.1 Temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE)	10
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Gojišča	12
3.1.2 Reagenti in barvila	12
3.1.3 Pufri in raztopine	12
3.1.4 Encimi	13
3.1.5 Oligonukleotidni začetniki	13
3.1.6 Testni kompleti	13
3.1.7 Oprema in aparature	13
3.1.7.1 Steklovina in potrošni material	13
3.1.7.2 Aparature	14
3.1.8 Programska oprema	14
3.2 METODE	14
3.2.1 Vzorčenje vode	14
3.2.1.1 Seznam in shema vzorčnih mest	15
3.2.2 Nacepljanje vzorcev na gojišča	16
3.2.2.1 Vodovodni sistem na Dolenjskem	16

3.2.2.2	Vodovodni sistem na Gorenjskem	16
3.2.3	Izolacija DNK	16
3.2.4	Merjenje koncentracije izolirane DNK	16
3.2.5	Čiščenje DNK	17
3.2.6	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	17
3.2.7	Agarozna gelska elektroforeza	18
3.2.8	Koncentriranje PCR produktov	18
3.2.9	Temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE)	18
3.2.9.1	Gelska elektroforeza s temperaturnim gradientom pravokotnim na smer potovanja DNK fragmentov	18
3.2.9.2	Gelska elektroforeza z vzdolžnim temperaturnim gradientom	19
3.2.10	Analiza 16S rRNK nukleotidnih zaporedij	20
4	REZULTATI	21
4.1	RAST PLANKTONSKIH BAKTERIJ NA GOJIŠČIH	21
4.2	REZULTATI IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ V VODOVODNEM SISTEMU Z MOLEKULARNO-BIOLOŠKIMI METODAMI	23
4.3	PRIMERJAVA SEZNAMA SORODNIKOV SEKVENCIRANIH FRAGMENTOV	35
4.4	RAZNOLIKOST BAKTERIJSKIH ZDRUŽB	38
4.5	ZASTOPANOST TAKSONOMSKIH SKUPIN BAKTERIJ V VODOVODNIH SISTEMIH NA DOLENJSKEM IN GORENJSKEM	43
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	45
6	POVZETEK	49
7	VIRI	51
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Prevladujoče heterotrofne bakterije v vodi	4
Preglednica 2: Glavne patogene bakterije, ki povzročajo bolezni z okuženo vodo	8
Preglednica 3: Seznam in opis vzorčnih mest VS na Dolenjskem	15
Preglednica 4: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov planktonskih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem	25
Preglednica 5: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov planktonskih bakterijskih združb izoliranih julija iz VS na Dolenjskem	26
Preglednica 6: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov planktonskih bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem	28
Preglednica 7: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov pritrjenih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem	29
Preglednica 8: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov pritrjenih bakterijskih združb izoliranih junija iz VS na Dolenjskem	31
Preglednica 9: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem	33
Preglednica 10: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov planktonskih bakterijskih združb izoliranih iz VS na Gorenjskem aprila 2008 in januarja 2009	34

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shema vodovodnega sistema na Dolenjskem z oznakami vzorčnih mest	15
Slika 2: Število CFU/100 mL na logaritemski skali na mFC agarju in MacConkey agarju po vzorčnih mestih za januar v VS na Dolenjskem	21
Slika 3: Število CFU/100 mL na logaritemski skali za različna gojišča za junij v VS na Dolenjskem.	22
Slika 4: Število CFU/100 mL na logaritemski skali za različna gojišča za oktober v VS na Dolenjskem	22
Slika 5: Število CFU/100 mL pri gojenju na MacConkey agarju v VS na Gorenjskem	23
Slika 6: TGGE gel s profilom planktonskih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem	25
Slika 7: TGGE gel s profilom planktonskih bakterijskih združb izoliranih julija iz VS na Dolenjskem	26
Slika 8: TGGE gel s profilom planktonskih bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem	27
Slika 9: TGGE gel s profilom pritrjenih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem	28
Slika 10: TGGE gel s profilom pritrjenih bakterijskih združb izoliranih junija iz VS na Dolenjskem	30
Slika 11: TGGE gel s profilom pritrjenih bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem	32
Slika 12: TGGE gel s profilom planktonskih bakterijskih združb izoliranih iz VS na Gorenjskem aprila 2008 in januarja 2009	34
Slika 13a: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v VS na Dolenjskem za januar	36
Slika 13b: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v VS na Dolenjskem za julij	36
Slika 13c: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v VS na Dolenjskem za oktober	36
Slika 14a: Vennov diagram sorodnikov planktonskih bakterijskih združb po letnih časih za VS na Dolenjskem	37
Slika 14b: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih bakterijskih združb po letnih časih za VS na Dolenjskem	37
Slika 14c: Vennov diagram zastopanosti skupnih sorodnikov sekvenc (pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb) po letnih časih za VS na Dolenjskem	37
Slika 15: Dendrogram za TGGE gel za planktonske bakterijske združbe prisotne januarja v VS na Dolenjskem	39
Slika 16: Dendrogram za TGGE gel za planktonske bakterijske združbe prisotne julija v VS na Dolenjskem	40

Slika 17: Dendrogram za TGGE gel za planktonske bakterijske združbe prisotne oktobra v VS na Dolenjskem	40
Slika 18: Dendrogram za TGGE gel za pritrjene bakterijske združbe prisotne januarja v VS na Dolenjskem	41
Slika 19: Dendrogram za TGGE gel za pritrjene bakterijske združbe prisotne julija v VS na Dolenjskem	41
Slika 20: Dendrogram za TGGE gel za pritrjene bakterijske združbe prisotne oktobra v VS na Dolenjskem	42
Slika 21a: Zastopanost skupin bakterij v planktonski bakterijski združbi v VS na Dolenjskem januarja	43
Slika 21b: Zastopanost skupin bakterij v planktonski bakterijski združbi v VS na Dolenjskem julija	43
Slika 21c: Zastopanost skupin bakterij v planktonski bakterijski združbi v VS na Dolenjskem oktobra	44
Slika 22a: Zastopanost skupin bakterij v pritrjenih bakterijskih združbah v VS na Dolenjskem januarja	44
Slika 22b: Zastopanost skupin bakterij v pritrjenih bakterijskih združbah v VS na Dolenjskem julija	44
Slika 22c: Zastopanost skupin bakterij v pritrjenih bakterijskih združbah v VS na Dolenjskem oktobra	44
Slika 23a: Zastopanost skupin bakterij v planktonskih bakterijskih združbah v VS na Gorenjskem aprila 2008	44
Slika 23b: Zastopanost skupin bakterij v planktonskih bakterijskih združbah v VS na Gorenjskem januarja 2009	44

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Koncentracija celokupne DNK izolirane iz planktonskih bakterijskih združb iz VS na Dolenjskem
- Priloga B: Koncentracija celokupne DNK izolirane iz pritrjenih bakterijskih združb iz VS na Dolenjskem
- Priloga C: Koncentracija celokupne DNK izolirane iz planktonskih bakterijskih združb iz VS na Gorenjskem
- Priloga D: Seznam vseh sekvenciranih fragmentov in njihovih najbližjih sorodnikov z izračunanimi p-razdaljami
- Priloga E: Filogenetska drevesa
- Priloga F: Mikrobiološki parametri, ki smo jih preverjali, in njihove mejne vrednosti določene s Pravilnikom o pitni vodi (2004)
- Priloga G: Rezultati kemijske analize vzorcev vode iz vodovodnih sistemov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOC	organski ogljik, ki ga bakterije lahko asimilirajo (angl. assimilable organic carbon)
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin trifosfat
CFU	število enot, ki formirajo kolonije (angl. colony-forming unit)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DPB	stranski produkti dezinfekcije (angl. Disinfection by-Product)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
PE	polietilen
PVC	polivinilklorid
RNK	ribonukleinska kislina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TGGE	temperaturna gradientna gelska elektroforeza
TOC	skupni organski ogljik (angl. total organic carbon)
VLBF	oznaka vzorcev planktonskih bakterijskih združb iz vodovodnega sistema na Dolenjskem
VLPL	oznaka vzorcev pritrjenih bakterijskih združb iz vodovodnega sistema na Dolenjskem
VM	vzorčno mesto
VS	vodovodni sistem
ZEL	oznaka vzorcev planktonskih bakterijskih združb iz vodovodnega sistema na Gorenjskem

1 UVOD

Pri skrbno vzdrževanih izvirih pitne vode, ki napajajo vodovodni sistem (VS), pogosto vzrok slabega stanja pitne vode pri uporabniku ne predstavljajo izviri, ampak kompleksna dogajanja v ceveh vodovodnega sistema. Pri tem se lahko po določenem času pri uporabniku pojavijo patogeni mikroorganizmi, ki pa v vodnem viru niso bili zasledeni (Kormas in sod., 2009)

Vzroki za takšno končno stanje so lahko:

1. Na izviru so lahko občasno prisotne patogene bakterije, ki pa jih zaradi občasnega načina vzorčenja zgrešimo (časovna raznolikost)
2. Na izviru so patogene bakterije prisotne v številu, ki je pod ravnjo detekcije klasičnih mikrobioloških metod zaradi premajhnega števila celic v vzorcu
3. Mikroorganizmi, ki bi lahko bili potencialno patogeni so v stanju mirovanja ali/in niso več kultivabilni in se s tem izognejo klasični mikrobiološki detekciji
4. Mikroorganizmi, ki se pojavljajo na izvoru v zelo majhnem številu, se pritrjajo na notranje površine cevi in počasi rastejo in so lahko sami patogeni ali pa tvorijo biofilme, ki omogočajo rast in zaščito potencialnim patogenom, ki pridejo le ob določenih dogodkih v vodovodni sistem – npr. pok cevi

Poleg tega, da so »nezaželeni« mikroorganizmi lahko prisotni že na izviru, lahko dodatno vstopijo v sistem kasneje v ceveh in vodočramih vodovoda (npr. zaradi poškodbe spojev, počene cevi, padca tlaka) in lahko predstavljajo resno težavo pri oskrbi s pitno vodo. Zato je pomembno ugotoviti njihovo prisotnost in oceniti ali bi lahko škodovali zdravju ali kakorkoli vplivali na kvaliteto vode.

Z zakonodajo je določeno preverjanje izbranih indikatorjev, ki nakazujejo na prisotnost patogenih mikroorganizmov. Ker zaenkrat preverjanje teh indikatorjev poteka samo z gojitvenimi tehnikami, to predstavlja resno pomanjkljivost ob dejstvu, da je možno gojiti samo približno 1% vseh mikroorganizmov (Defives in sod., 1999). Alternativno predstavljajo molekularne tehnike (npr. temperaturna in denaturacijska gradientna gelska elektroforeza), s katerimi je možno analizirati tudi mikroorganizme, ki niso kultivabilni. Te tehnike so zelo uporabne, saj lahko zaenkrat zajamemo celotno populacijo mikrobne združbe in omogočajo spremeljanje njene prostorske in časovne dinamike, s sekvenciranjem ločenih fragmentov pa je možno točno identificirati predstavnike, ki se v združbi nahajajo.

Kljub uporabnosti molekularnih tehnik zaenkrat še ni bilo opravljenih veliko raziskav strukture bakterijskih združb v VS. V raziskavah, ki pa so bile opravljene so ugotovili, da prevladujejo predvsem bakterije razreda *Betaproteobacteria* (Eichler in sod., 2006; Kormas in sod., 2009), sledijo pa jim bakterije iz razredov *Alphaproteobacteria* in *Bacteroidetes* (Eichler in sod., 2006).

1.1 NAMEN DELA

Pitna voda je pomembno živilo, ki ima lahko velik vpliv na zdravje človeka. Najpogosteje je za negativen vpliv na človekovo zdravje krivo slabo mikrobiološko stanje pitne vode in prisotnost patogenih mikroorganizmov, zaradi česar je pomembno poznati mikrobiološko stanje pitne vode. Zato smo se odločili, da bomo določili strukturo bakterijske združbe v dveh lokalnih vodovodih:

- prvi je s področja Dolenjske in ima probleme z mikrobiološko ustreznostjo pitne vode, drugi, ki je s področja Gorenjske, pa je utrpel večje poškodbe med naravno nesrečo
- ločeno smo obravnavali strukturo planktonske in pritrjene bakterijske združbe ter ju med seboj primerjali
- ovrednotili smo sezonsko dinamiko in spremembo bakterijske združbe po čiščenju in dezinfekciji vodovoda s klasično uporabo kloriranja

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- struktura bakterijske združbe je na različnih točkah vodovodnega sistema različna
- bakterijska združba se spreminja tudi glede na letni čas in zaradi dezinfekcije
- struktura planktonske bakterijske združbe se razlikuje od strukture pritrjene bakterijske združbe
- bakterijska združba v vodovodu se razlikuje od bakterijske združbe na izviru

2 PREGLED OBJAV

2.1 VODOVODNI SISTEM

Vodovodni sistem (VS) je sestavljen iz med seboj soodvisnih elementov (Podlipnik, 2007), kot so cevi, črpalke, ventili, števci, pipe, tesnila, rezervoarji in drugi hidravlični dodatki. Njegov namen je dostava kakovostne in varne pitne vode od vodnega vira do odjemalcev v zadostnih količinah, s primernim tlakom, z minimalnimi izgubami in ekonomično kot je le mogoče. Da je tem zahtevam zadoščeno, je pomembno, da ne pride do izgube integritete VS, za katero so ključne tri komponente: fizična integriteta, hidravlična integriteta in integriteta mikrobiološke varnosti vode (Committee on Public Water ..., 2006). Grožnjo integriteti VS predstavljajo starost in material cevi, sestava in velikost VS, obloge (biofilmi), korozija, shranjevanje vode, sedimentacija, kemijske reakcije v vodi in prisotnost ter rast mikroorganizmov (O'Connor, 2002).

Prisotnost mikroorganizmov oz. mikrobiološka kvaliteta vode je precej odvisna od kvalitete vodnega vira. V Sloveniji jih glede na delež odjemalcev v večini predstavljajo nepovršinske vode, in sicer skoraj 70 % (Monitoring pitne ..., 2008), medtem ko ponekod v svetu, količinsko gledano, večino vodnih virov predstavljajo površinske vode (npr. v Veliki Britaniji kar 70 %) (Percival in sod., 2000). Pogosto je prednost nepovršinskih voda v njeni kvaliteti, saj potrebuje manj obdelave od površinskih, če okolje ni onesnaženo (Klun, 2003). Ponavadi je edino tretiranje kloriranje, površinske vode pa morajo iti skozi več postopkov kot so aeracija, koagulacija, flokulacija, sedimentacija, filtracija in dezinfekcija preden so primerne za distribucijo (Percival in sod., 2000). Takih sistemov za pripravo pitne vode praviloma nimajo vgrajeni manjši vodovodni sistemi, ki oskrbujejo manj kot tisoč prebivalcev (Podlipnik, 2007). Takšni vodovodni sistemi, z oskrbo do 1000 prebivalcev, v Sloveniji predstavljajo skoraj 81 % oskrbovalnih območij, a kljub temu oskrbujejo le približno 9 % prebivalcev (Monitoring pitne ..., 2008).

2.2 MIKROBIOLOGIJA VODOVODNEGA SISTEMA

Kljub čiščenju in obdelavi izvorne vode je običajno, da pri končnem porabniku ugotovimo prisotnost mikroorganizmov. Ti mikroorganizmi so navadno neškodljivi za porabnika, problem pa lahko nastane, če so med njimi patogeni. Povzročijo lahko infekcije gastrointestinalnega trakta, kože, sluznic in v najhujših primerih lahko smrt. Čedalje večji problem predstavljajo tudi ti nepatogeni mikroorganizmi, ker se v človeški populaciji povečuje število imunokompromitiranih oseb. Takšnim osebam predstavljajo že ti normalno prisotni mikroorganizmi veliko grožnjo (Szewzyk in sod., 2000; Ford, 1999). Prav tako nezaželeni kot patogeni so mikroorganizmi, ki spremenijo senzorične lastnosti vode, voda zaradi njih lahko postane motna, neprijetnega okusa in vonja (Klun, 2003).

Največji del števila mikroorganizmov v VS predstavljajo bakterije (Percival in sod., 2000), ki so lahko avtohtone (voda je njihovo naravno okolje) ali alohtone (v vodo pridejo iz zemelje, rastlinske flore, zraka, ljudi in živali) (Klun, 2003). Prisotnost bakterij je možno ovrednotiti z rastjo le-teh na različnih gojiščih.

Za preverjanje mikrobiološkega stanja VS lahko uporabimo gojenje na različnih neselektivnih gojiščih (npr. SPC agar, NA agar, YEA agar) pri različnih temperaturah. Na ta način gojimo heterotrofne bakterije (HPC- heterotrophic plate count) (Allen in sod., 2004). Hranilne snovi (organske snovi) v VS predstavljajo huminske in fulvo kisline, ogljikovi hidrati, proteini in karboksilne kisline (LeChevalier in sod., 1991) in jih je zelo malo, bakterije pa so se sposobne prilagoditi na take razmere (Klun, 2003). Pri gojenju na gojiščih je potrebno upoštevati, da vseh bakterij ni možno gojiti.

Preglednica 1: Prevladajoče heterotrofne bakterije v vodi (Allen in sod., 2004; Geldreich, 1996)

<i>Acinetobacter</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Moraxella</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Nitrobacter</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Nitrosomonas</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Nocardia</i>
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	<i>Proteus</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Bacillus</i>	<i>P. cepacia</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>P. diminuta</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>P. fluorescens</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>P. maltophilia</i>
<i>Crenothrix</i>	<i>P. pickettii</i>
<i>Desulfovibrio</i>	<i>P. putida</i>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>P. stutzeri</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>P. vesicularis</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	<i>Sphingomonas</i>
<i>Gallionella</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Methylomonas</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Micrococcus</i>	

Bakterije, ki jih ni možno gojiti, lahko detektiramo z molekularnimi tehnikami. Eichler in sod. (2006) so na tak način odkrili, da se v VS nahajajo predvsem bakterije razredov *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* in *Bacteroidetes*. Razred *Betaproteobacteria* kot prevladajočega navajajo tudi Kormas in sod. (2009), vendar le v zunanjem VS. V hišnih omrežjih so zasledili prevlado mikrobakterijam podobnih filotipov (*Mycobacterium*-like phylotypes). Ker so eden izmed virov mikroorganizmov v VS vodni viri, je pomembno vedeti, kateri mikroorganizmi se nahajajo v njih. Pronk in sod. (2009) so preučevali mikrobne združbe v kraških izvirih, ki so pogost tip vodnega vira tudi v Sloveniji, in ugotovili prisotnost bakterijskih vrst predvsem iz razredov *Delta proteobacteria*, *Acidobacteria* in *Nitrospira*. Pogost tip vodnega vira pri nas je tudi podtalnica, v kateri so Ultee in sod. (2004) odkrili večinoma vrste iz razreda *Betaproteobacteria*.

2.3 PRITRJENE BAKTERIJSKE ZDRUŽBE (BIOFILMI)

Biofilm je kompleksna mikrobna združba, sestavljena večinoma iz bakterij, ki nastane na različnih površinah in je obdana z ekstracelularnimi polimernimi snovmi (Costerton, 1995). Nastanek biofilma poteka v petih stopnjah:

- nastanek prilagoditvenega sloja
- transport bakterij na površino
- pritrditev bakterij na površino
- rast in nastanek mikrokolonij ter kolonizacija ostalih organizmov (npr. mikroalge)
- procesi priraščanje in sproščanja mikroorganizmov iz biofilma

Prilagoditveni sloj v vodnih okoljih je pretežno iz organskih snovi (polisaharidi, glikoproteini in huminske snovi). Njegova vloga pri procesu pritrditve bakterij je prilagoditev fizikalno-kemijskih lastnosti podlage, ki ima potem naslednje funkcije (Chamberlain, 1992, cit. po Percival in sod., 2000):

1. Deluje kot koncentriran vir hranil in elementov v sledovih
2. Zmanjšuje izhajanja toksičnih kovinskih ionov iz površine
3. Zmanjšuje negativen vpliv raztopljenih inhibitornih substanc

Ker sta koncentracija hranil in število mikroorganizmov v pitni vodi majhna, je eden izmed ključnih dejavnikov pri nastanku biofilmov transport mikroorganizmov. Transport mikroorganizmov na površino je posledica gibanja oz. toka tekočine ali pa z prerazporeditvijo pritrjenih celic po površini s flageli, fimbrijami, pili in rojenjem. Flagele, fimbrije in pili so tudi strukture s katerimi se mikrobne celice pritrdijo na površino (Percival in sod., 2000; Hall-Stoodley in Stoodley, 2002; Verstraeten in sod., 2008).

Pritrditev bakterij na podlago je lahko reverzibilna ali ireverzibilna. V času reverzibilne pritrditve bakterije vzpostavijo stik s površino oz. substratom in začnejo rasti. Ker so celice pritrjene s šibkimi van der Waalsovimi silami se lahko od substrata odstranijo že zaradi šibkih strižnih sil. Če celice ostanejo pritrjene in uspešno rastejo, začnejo izločati ekstracelularne polimere preko katerih se nato ireverzibilno vežejo na površino. Za irevezibilno pritrditev so poleg van der Waalsovih sil potrebne še elektrostatske in specifične interakcije med površino in bakterijami (Busscher in Weerkamp, 1987; Stoodley in sod., 2002).

Pritrjene bakterije rastejo, se razmnožujejo in nastanejo mikrokolonije, ki so osnovne strukturne in funkcionalne enote biofilma. Zasedajo jih lahko bakterije ene ali več vrst (Costerton, 1995). Pri nastanku mikrokolonij pride do povečane produkcije ekstracelularnih polimerov (EPS), ki biofilm držijo skupaj. EPS predstavljajo od 50 do 80 % organske snovi v biofilmih in so po kemijski sestavi polisaharidi, proteini in lipidi (Sutherland, 2001). Pomembni so tudi zaradi zaščite celic pred okoljem in biocidi, omogočanja medcelične komunikacije, adsorbcije hranil, mikrobnih produktov in drugih mikrobov (Percival in sod., 2000). Pri nastajanju mikrokolonij in zorenju biofilma ter pri uravnovanju produkcije EPS ima pomembno vlogo mehanizem za zaznavanje celične gostote, čeprav zaenkrat celoten proces še ni popolnoma razjasnjen (Nadell in sod., 2008).

Sproščanje celic iz biofilma in odlepljanje biofilma je lahko posledica delovanja določenih encimov (Boyd in Chakrabarty, 1994), zmanjšanja produkcije EPS (Allison in sod., 1998) in pomanjkanja hranil (O'Toole in sod., 2000). Lahko pa je tudi posledica delovanja strižnih sil vode, predatorjev in posredovanja človeka (Percival in sod., 2000).

Dolgo časa je veljalo, da je struktura biofilma planarna, saj so prve raziskave strukture opravili z elektronskimi mikroskopimi, pri tem pa je zaradi sušenja biofilma prišlo do njegovega sesedanja in sprememb v strukturi. Do napredka pri ugotavljanju strukture biofilmov je prišlo z razvojem vrstične laserske konfokalne mikroskopije (CLSM) in danes velja, da mikrokolonije razvijejo gobi podobno obliko s tankimi stebri med kateri potekajo vodni kanali (Costerton, 1995; Wimpenny in sod., 2000).

Za biofilme je značilna velika genetska in fiziološka heterogenost. Razlog je v mikrogradientu snovi v biofilmu (kemijska heterogenost), prilagoditvi na lokalne okoljske razmere, naključnem preklapljanju genov, genski variaciji in naravni selekciji. Vsi ti mehanizmi omogočajo, da celice z različnimi genotipi in fenotipi živijo skupaj (Stewart in Franklin, 2008).

2.3.1 Biofilmi v vodovodnem sistemu

Zaenkrat še ni rutinske preiskave biofilmov v VS zaradi nedostopnosti le-teh, zato so raziskave usmerjene v laboratorijske simulacije in pilotne sisteme, ki pa zaradi velikega števila spremenljivk ne morejo popolnoma posnemati dogajanja v VS (Percival in sod., 2000).

Na nastanek biofilmov in njihovo strukturo v VS vpliva več dejavnikov. Največ pozornosti v raziskavah je bilo namenjeno prisotnosti ogljika v obliki AOC (Assimilable Organic Carbon), hidrodinamskim pogojem in dezinfekciji, pomembni pa so tudi temperatura, prisotnost produktov korozije in vrsta materiala (Camper in sod., 1999).

Struktura biofilmov je spremenjena predvsem zaradi dezinfekcije in strižnih sil. Biofilmi postanejo krpaste oblike (patchy), celice so približno 50 % manjše, spremeni se tudi njihova oblika in sicer podolgovate ovalne celic nadomestijo bolj okrogle. Prav tako se spremeni vrstna sestava bakterij prisotnih v biofilmu (Camper in sod., 1999). Najpogosteje so prisotne bakterije iz rodov *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter* in *Micrococcus* (Klun, 2003).

2.3.2 Razvoj biofilmov na različnih materialih

Ne glede na to iz česa so cevi narejene jih po določenem času naselijo mikroorganizmi (Niquette in sod., 2000; Zacheus in sod., 2000). Preko hrapavosti, sposobnosti vezave vode in adhezivnih lastnosti material vpliva na pritrjanje pionirskih vrst in lahko deluje kot vir hrani ali pa favorizira rast določenih vrst bakterij (Batté in sod., 2003). Podatki o tem, kateri material je bolj primeren so zelo različni. Zacheus in sod. (2000) kljub ozoniranju vode niso ugotovili bistvene razlike v akumulaciji biofilmov na površine iz različnih materialov (PE, PVC in nerjaveče jeklo), tudi skupno število celic je bilo podobno, razlika

je bila le pri številu heterotrofnih bakterij, ki je bilo večje v ozonirani vodi. Število heterotrofnih bakterij in koliformnih na različnih površinah so primerjali tudi Camper in sod. (1999), in sicer so ugotovili, da so bile jeklene površine kolonizirane 100-krat bolj s heterotrofi in 2 do 10-krat bolj s koliformi, kot pa polikarbonatne. Podobno poročajo tudi Niquette in sod. (2000), ki so ugotovili da je bila količina biomase na površini železnih cevi kar 10 do 45-krat večja kot na površini cevi iz PE in PVC.

Zaradi razraščanja biofilmov po površini cevi pogosto biofilmci povzročijo veliko različnih težav:

- bakterije v biofilmih lahko predstavljajo začetek prehranjevalnega spleta in omogočajo rast višjim organizmom
- prisotnost določenih bakterij v biofilmu lahko povzroči motnost, obarvanje in neprijeten vonj ter okus pitne vode
- povzročajo korozijo
- visoko število heterotrofnih bakterij lahko moti detekcijo koliformnih bakterij (Hallam in sod., 2001)
- omogočajo rast oportunističnim in drugim patogenim mikroorganizmom (Van der Kooij, 2000)

Glavna pristopa pri zmanjševanju naštetih težav sta primerna dezinfekcija in distribucija biološko stabilne pitne vode v sistem, ki je zgrajen iz biološko stabilnih materialov, ko so ti v stiku z vodo. Biološka stabilnost je v tem primeru definirana kot nezmožnost omogočanja rasti mikroorganizmov kadar ni prisotnega biocida. Biostabilnost vode se lahko oceni s AOC in BFR testom. Z AOC (Assimilable Organic Carbon) testom določimo količino organskega ogljika, ki je na voljo mikroorganizmom v VS. V tretirani vodi je ta vrednost ponavadi pod $10 \mu\text{g C/l}$ (Van der Kooij, 2000). Z BFR (Biofilm Formation Rate) testom pa posredno, preko merjenja koncentracije ATP na steklenih cilindrih, ki so bili izpostavljeni testirani vodi, določimo povečanje biomase v odvisnosti od časa (Van der Kooij in sod., 1995). Biostabilnost materialov se testira z BFP (Biofilm Formation Potential) testom, kjer se material inkubira v biološko stabilni vodi določen čas pri 25°C . Tudi pri tem testu se količino biofilma določi posredno preko meritev ATP-ja, rezultat pa se poda v pg ATP na enoto površine (Van der Kooij, 1999).

2.4 PATOGENE BAKTERIJE V VODOVODNEM SISTEMU

Če VS nima sistema za pripravo pitne vode ali ta ne deluje dobro, patogene bakterije lahko vstopijo v VS že na njegovem začetku direktno iz vodnega vira ali kasneje zaradi porušene integritete VS (Besner in sod., 2002, cit. po Batté in sod., 2003)

Izvor patogenov so lahko odpadne vode, ostanki mulja po obdelavi odpadnih vod, odlivi iz greznic (Likar, 2000) ali pa bakterije, ki so naravno prisotne v okolju in so sposobne preživeti in rasti v VS (Szewzyk in sod., 2000). V VS se nahajajo v biofilmih, produktih korozije in sedimentih, od tod pa se sprostijo ob popravilih, čiščenju ali eroziji (Safe piped water ..., 2004).

Preglednica 2: Najpogosteje patogene bakterije, ki povzročajo bolezni z okuženo vodo (Guidelines for drinking-water ..., 2006)

Bakterija	Preživetje v vodovodnem sistemu	Živalski izvor
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	lahko se razmnožuje	Ne
<i>Campylobacter jejuni, C. coli</i>	od 1 tedna do 1 meseca	Da
Patogeni sevi <i>E. coli</i>	od 1 tedna do 1 meseca	Da
<i>Legionella</i> spp.	se razmnožuje	Ne
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	lahko se razmnožuje	Ne
<i>Salmonella typhi</i>	od 1 tedna do 1 meseca	Ne
ostale salmonele	lahko se razmnožujejo	Da
<i>Vibrio cholerae</i>	do 1 tedna	Ne
<i>Shigella</i> spp.	do 1 tedna	Ne
<i>Yersinia enterocolitica</i>	več kot 1 mesec	Da

Pomembni so še oportunistični patogeni, ki so naravno prisotni v okolju in običajno niso patogeni. Pri starejših, zelo mladih in imunokompromitiranih osebah pa lahko povzročijo različne infekcije kože ali sluznic. Te bakterije so *Pseudomonas aeruginosa*, bakterije iz rodov *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Aeromonas* in nekatere mikrobakterije (Klun, 2003).

Patogene bakterije so poleg virusov in parazitov lahko tudi povzročiteljice množične zastrupitve z vodo oz. hidričnega izbruha, ki ga WHO definira kot primer, ko vsaj dve osebi ali več, zbolita po zaužitju vode iz istega vira. Najpogosteje posledice so driska, krči v trebuhu, bruhanje, vročina in v skrajnih primerih tudi smrt. Posledice hidričnih izbruuhov pa niso samo zdravstvene ampak tudi gospodarske, kar se je pokazalo na primeru hidričnega izbruha kriptosporidioze v Milwaukeeu leta 1993, saj je zbolelo 52 % populacije mesta (403.000), stroški izbruha pa so bili ocenjeni na nekaj manj kot 100 milijonov US\$. V Sloveniji imamo v povprečju približno 3 izbruhe letno, med dokazanimi povzročitelji pa je *Shigella sonnei* daleč pred vsemi na prvem mestu (Hočevar Grom in sod., 2005)

2.5 INDIKATORJI MIKROBIOLOŠKE KVALITETE PITNE VODE

Pravilnik o pitni vodi (2004) navaja, da je pitna voda z mikrobiološkega stališča zdravstveno ustrezna, kadar ne vsebuje mikroorganizmov, parazitov in njihovih razvojnih oblik v številu, ki lahko predstavlja nevarnost za zdravje ljudi. Da se zagotovi nadzor nad zdravstveno ustreznostjo, je potrebno izvajati mikrobiološke teste. Ker pa so stroški za uporabo specifičnih metod za ugotavljanje patogenov veliki, se uporablja za oceno njihove prisotnosti indikatorje (Klun, 2003). Indikatorji, ki jih je po Pravilniku o pitni vodi (2004) potrebno preveriti so prisotnost *E. coli*, koliformnih bakterij, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, enterokokov in število kolonij pri 22°C in 37°C (za mejne vrednosti glej prilogo F). Pri interpretaciji rezultatov je potrebno biti previden in upoštevati, da ni absolutne povezave med številom prisotnih indikatorjev in dejansko prisotnostjo oz. številom patogenov (The Microbiology ..., 2002).

2.5.1 Mikrobiološke preiskave

Najpogosteja metoda, ki se uporablja za izvajanje mikrobioloških testov, je membranska filtracija (določena po Pravilniku o pitni vodi, 2004) z gojenjem na selektivnih gojiščih.

Uporablja se lahko tudi MPN metode (najbolj verjetno število), ki pa po pravilniku niso določene, vendar jih je možno uporabiti pri preizkušanjih, če se lahko dokaže, da so dobljeni rezultati vsaj toliko zanesljivi kot rezultati, ki jih dajejo navedene metode v pravilniku (IVZ RS, 2008).

2.6 DEZINFEKCIJA PITNE VODE

Noben izmed biocidov ni idealen, vsak ima svoje prednosti in slabosti, zato jih izberemo glede na potrebe in možnosti uporabe. Najpogosteje pa se za dezinfekcijo še vedno uporablja klor. Za večja tretiranja ga dozirajo kot plin, ta v vodi reagira in nastane hipoklorova kislina in hipoklorit. V manjših VS ga dodajajo indirektno kot natrijev hipoklorit. Klor onemogoči mikroorganizme tako, da vpliva na permeabilnost celice in poškoduje nukleinske kisline ter encime (Percival in sod., 2000). Pri kloriranju nastanejo THM-trihalometani in HAA-haloacetne kisline, ki so stranski produkti dezinfekcije (DBP-Deinfection By-Product) in so dokazano kancerogeni (Gopal in sod., 2007). Zato poskušamo uporabljati druge biocide, ki ne tvorijo spojin s podobnim učinkom. Na voljo je več alternativ, najpogosteje izmed njih uporabljajo klorov dioksid, ozon, kloramine in ultravijolično (UV) svetlobo (Percival in sod., 2000).

Za uničenje bakterij, ki se nahajajo v biofilmih, je potrebno uporabiti večjo koncentracijo biocida kot pa je potrebna za uničenje planktonskih bakterij. Ko se bakterije nahajajo v biofilmu oz. so pritrjene na podlago, se njihova občutljivost na biocide, še posebej na klor, močno zmanjša. Ta učinek je še posebej opazen pri starejših biofilmih (LeChevallier in sod., 1988). Zato bi bilo pomembno primarno preprečiti nastanek biofilma, ker pa je to zaenkrat nemogoče, ga je potrebno poskušati kontrolirati. Codony in sod. (2005) so v pilotnem sistemu ciklično klorirali vodo in preverjali vpliv klora na biofilme in bakterije v vodi. Ugotovili so, da se je med vsakim premorom pred naslednjim ciklom število planktonskih viabilnih bakterij v vodi povečalo za 10-krat, število viabilnih planktonskih celic po petih ciklih pa je bilo 4-krat večje kot na začetku poskusa pred kloriranjem. Za bolj učinkovitega pri zaviranju nastanka biofilma, se je pokazal kloramin, še posebej pri temperaturah vode nad 15°C (Berman in sod., 1988).

2.7 METODE ZA UGOTAVLJANJE STRUKTURE MIKROBNIH ZDRUŽB

V preteklosti so mikroorganizme v določnem okolju ali industrijskem procesu preučevali z mikroskopskimi in gojitvenimi tehnikami. Danes je znano, da s takimi metodami ne moremo zaznati manjših populacij mikroorganizmov in mikroorganizmov, ki za rast potrebujejo specifične pogoje. Taki so tudi mikroorganizmi, ki so pod stresom ali pa so poškodovani in zato potrebujejo posebne pogoje da si opomorejo in postanejo kultivabilni. Obstaja pa tudi veliko število mikroorganizmov, ki jih na danes poznanih gojiščih ne moremo gojiti pri nobenih pogojih (Justé in sod., 2008). Defives in sod. (1999) so ugotovili, da na gojiščih raste lahko samo približno 1 % bakterij iz okolja, Ampe in sod. (1999) pa so ugotovili, da celo v fermentirani hrani, kjer kultivabilni mikroorganizmi močno prevladujejo, 25-50% aktivne mikrobne združbe predstavljajo mikroorganizmi, ki niso kultivabilni.

2.7.1 Molekularne tehnike

Danes so v uporabi predvsem molekularne tehnike, ki ne zahtevajo gojenja mikroorganizmov na gojiščih in predstavljajo veliko priložnost pri raziskovanju in razumevanju mikrobne diverzitete. Te metode delujejo na osnovi detekcije in karakterizacije nekaterih molekul, ki sestavljajo mikroorganizme, to so nukleinske kisline, proteini in maščobne kisline (Malik in sod., 2008).

Večinoma uporabljam molekularne tehnike, ki imajo za osnovo detekcijo in karakterizacijo nukleinskih kislin:

- TGGE (temperaturna gradientna gelska elektroforeza)
- DGGE (denaturacijska gradientna gelska elektroforeza)
- SSCP (enoverižni komfomacijski polimorfizem)
- T-RFLP (polimorfizem terminalnih restrikcijskih fragmentov)
- ARDRA (analiza restrikcijskih fragmentov pomnožene rDNK)
- RISA (polimorfizem dolžin DNK regij med 16S in 23S rRNK genov)
- Izdelava klonskih knjižnic (Justé in sod., 2008)

Vse naštete tehnike imajo enak način priprave vzorca. Najprej je potrebno izolirati DNK ali RNK, nato pomnožiti gen za 16S rRNK (razen pri RISA), sledi pa analiza PCR produktov z izbrano tehniko (Muyzer, 1999). Gen za 16S rRNK kodira ribosomalno RNK, ki je sestavni del ribosomov, možno pa je uporabiti več regij tega gena, kot so npr. V3, V1-V3, V7-V8, V6-V8, V9 (Justé in sod., 2008). Njegove filogenetske lastnosti (podlaga za klasifikacijo bakterijskih vrst) in velika količina zbranih nukleotidnih zaporedij v bazah podatkov predstavljajo veliko prednost pri njegovi uporabi (Dahllöf, 2002). Pojavlja se tudi nekaj pomanjkljivosti, ki so predvsem posledica heterogenosti gena za 16S rRNK med različnimi kopijami gena pri isti vrsti (Shimizu in sod., 2001).

2.7.1.1 Temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE)

TGGE je molekularna tehnika s katero ločimo DNK fragmente enake dolžine z različnim nukleotidnim zaporedjem. Ločevanje temelji na zmanjšani elektroforetski mobilnosti delno raztopljenih dvojerižnih DNK fragmentov v poliakrilamidnem gelu ob linearinem temperaturnem gradientu. Ko pri kritični temperaturi-temperaturi razapljanja (T_m) pride do razapljanja DNK fragmentov, se jim spremeni struktura in se prenehajo gibati v električnem polju. Razlike v temperaturi razapljanja fragmentov nastanejo zaradi različnih nukleotidnih zaporedij. Fragmenti se vizualizira z barvanjem z različnimi barvili. Najprej je bil v uporabi etidijev bromid, nadomestil pa ga je predvsem SYBR Green I, ki manj obarva ozadje, zaradi tega bolj pridejo do izraza tudi manj dominantni fragmenti. Še bolj občutljiva metoda je barvanje z srebrom, vendar je problem, ker se obarva tudi enoverižna DNK (Muyzer in Smalla, 1998). Fragmenti lahko izrežemo in jih sekvenciramo (Muyzer, 1999).

Da preprečimo popoln razklop dvojne viačnice, je potrebno pri pomnoževanju DNK vzorca uporabiti oligonukleotidni začetnik, ki ima na 5'-koncu dodano zaporedje iz gvanina

(G) in citozina (C), t.i. GC spono. To zaporedje je dolgo okrog 40 baznih parov (Sheffield in sod., 1989).

S PCR pomnoženim DNK fragmentom je potrebno pred izvedbo TGGE-ja določiti temperaturno območje, v katerem pride do njihovega raztapljanja. V ta namen izvedemo gelsko elektroforezo s temperaturnim gradientom, ki je v pravokotni smeri na smer potovanja DNK fragmentov, ki se jih nanese po celotni širini gela. Po končani elektroforezi in barvanju se DNK porazdeli v obliki sigmoidne krivulje. Tam, kjer je temperatura najnižja, DNK potuje kot dvojna vijačnica, kjer pa je najvišja, se DNK raztopi kmalu po začetku elektroforeze in ostane na tistem mestu. Na vmesnih temperaturah se DNK različno raztaplja in ima s tem skladno mobilnost (Muyzer in Smalla, 1998).

TGGE je zelo močno orodje za primerjavo strukture mikrobne združbe kot tudi za spremljanje dinamike mikrobne populacije (prostorsko in časovno). Glavne prednosti so v dostopnosti analize molekularnim laboratorijem, teoretični možnosti ločiti zaporedja, ki se razlikujejo le v enem ali nekaj baznih parih, relativno lahki interpretaciji rezultatov (Justé in sod., 2008) in preprosti detekciji prevladujočih vrst mikroorganizmov (Malik in sod., 2008).

Zadržki za uporabo TGGE se nanašajo na velikost gelov, nastanek dimerov oligonukleotidnih začetnikov in spremenljivega barvanja gelov (Justé in sod., 2008). Zaradi obstoja več kopij rRNK gena v organizmu lahko nastane več ločenih fragmentov za isti organizem na istem gelu (Nübel in sod., 1996), težavo pa lahko predstavljajo tudi različne sekvence 16S rRNK, ki imajo isto mobilnost v gelu in se na gelu pokažejo kot en fragment, kar ima rezultat v majhni kakovosti sekvenciranega zaporedja (Sekiguchi in sod., 2001).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Gojišča

- Chromocult® Coliform Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Chromocult® Enterococci Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- LB agar (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- gojišče MacConkey (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- mFC Agar (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

3.1.2 Reagenti in barvila

- 6X Loading Dye (Fermentas, Litva)
- agarozna (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- akrilamid : bisakrilamid (60 :1)
 - a) 200 mL 30 % akrilamida (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemčija)
 - b) 50 mL 2 % bisakrilamida (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Nemčija)
- Sybr Green I (Fluka)
- dNTP Mix (Applied Biosystems, USA)
- dNTP Mix(Fermentas, Litva)
- TGGE barvilo:
 - a) 0,146 g EDTA (5 mM)
 - b) 0,005 g Bromofenola modro (0,05 %)
 - c) 50 µL Triton – X 100 (0,5 %)
 - d) 5x TAE pufer do 10 mL
- urea (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- formamid (Mallinckrodt Baker, AA Deventer, Netherlands)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 10 % APS
 - a) 1 g APS (amonijev persulfat)
 - b) dH₂O do 10 mL

3.1.3 Pufri in raztopine

- 10X PCR pufer (Applied Biosystems, USA)
- 10X Taq pufer (Fermentas, Litva)
- Acryl Glide raztopina (Amresco, USA)
- fiziološka raztopina
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Litva)
- Lambda DNA/PstI Marker, 24 (Fermentas, Litva)

- MgCl₂ (Applied Biosystems, USA)
- MgCl₂ (Fermentas, Litva)
- MilliQ voda
- TAE pufer 50x:
 - a) 242 g Tris baze
 - b) dH₂O do 500 mL
 - c) 57,1 mL acetilne kislina (etanojska kislina)
 - d) 100 mL 0,5 M EDTA
 - e) dH₂O do 1000 mL, pH=8,0
- TAE pufer 1,25x:
 - a) 25 mL 50x TAE pufra
 - b) dH₂O do 1000 mL
- 40 % glicerol:
 - 31,7 mL 100 % glicerola
 - dH₂O do 60 mL
- 0,01 % triton
 - 10 µL 100 % tritona
 - dH₂O do 100 mL

3.1.4 Encimi

- Taq DNK polimeraza (Fermentas, Litva)
- AmpliTaq® DNK polimeraza (Applied Biosystems, USA)

3.1.5 Oligonukleotidni začetniki

- 1401r (5' – CGGTGTGTACAAGACCC- 3')
- U986 (5'- AACCGAAGAACCTTAC- 3')
- U986-GC (5' – (GC-spona)-AACGCAAGAACCTTAC- 3')

3.1.6 Testni kompleti

- Quanti-It™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen)
- SmartHelix™ Nucleic Acid Extraction Kit (IFB, Slovenija)

3.1.7 Oprema in aparature

3.1.7.1 Steklovina in potrošni material

- brizge (60 mL)
- centrifugirke (50 mL)
- čaše
- erlenmajerice
- injekcijske brizge (1 mL)
- magneti

- merilni valji
- nastavki za pipetiranje
- parafilm
- petrijeve plošče
- sterilni membranski filtri premera 47 mm in premerom por 0,22 µm (Millipore)
- sterilni membranski filter s premerom por 0,22 µm (TPP)
- sterilni filter s premerom por 0,22 µL (Sartorius)
- sterilne ščetke

3.1.7.2 Aparature

- avtomatske pipete
- centrifuga (Sigma 2-16K)
- črpalka
- digestorij
- stresalnik
- inkubator (Memmert)
- kadička za elektroforezo (Mini-Sub[®] Cell GT, Biorad)
- PowerPacTM Basic, Biorad
- magnetno mešalo (Hanna Instruments)
- sistem za filtriranje vode
- sistem za koncentriranje vzorcev (Millipore)
- Multimeter
- tehtnica (Kern)
- TGGE MAXI System Controller (Biometra)
- TProfessional Thermocycler (Biometra)
- transiluminator (BioDoc Analyze, Biometra)
- vorteks

3.1.8 Programska oprema

- BioDoc Analyze 2.1 (Biometra)
- MEGA 4.0 (Tamura in sod., 2007)
- Bioedit (Hall, 1999)

3.2 METODE

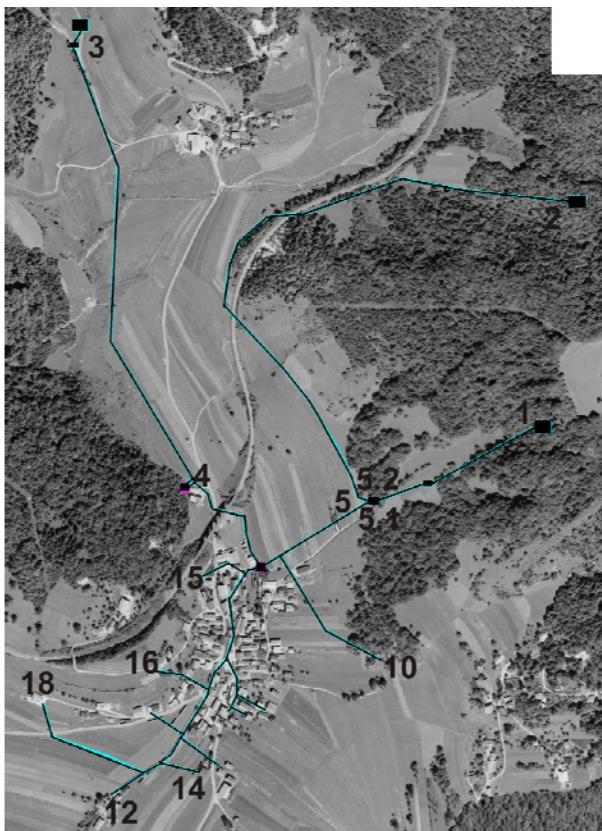
3.2.1 Vzorčenje vode

Vzorčenje vodovodnega sistema na Dolenjskem je potekalo na 13 vzorčnih mestih trikrat (31.1.08, 8.7.08, 15.10.08), na Gorenjskem pa na 6 vzorčnih mestih dvakrat (8.4.08 in 28.1.09 (vzorci v treh ponovitvah)). Vzorce smo analizirali isti dan. Na vsakem vzorčnem mestu smo odvzeli:

- 5 L vode v plastenke za izolacijo DNK iz planktonskih bakterijskih združb

- 300 mL vode v plastenke za mikrobiološke analize
- 1 L vode v steklenice za kemijske analize
- vzorec biofilma smo odvzeli s sterilnimi ščetkami s katerimi smo podrgnili po površini in zbran material sprali v fiziološki raztopini v centrifugirki (samo iz VS na Dolenjskem)

3.2.1.1 Seznam in shema vzorčnih mest



Slika 1: Shema vodovodnega sistema na Dolenjskem z oznakami vzorčnih mest, merilo zemljevida 1:3166 (Atlas okolja, 2007)

Preglednica 3 : Seznam in opis vzorčnih mest VS na Dolenjskem

Oznaka vzorčnega mesta (VM)	Opis vzorčnega mesta
1	Izvir
2	Izvir
3	Izvir
4	Cev za izpust na črpališču (voda priteče iz VM 3)
5	Vodočram (voda priteče iz VM 1 in 2)
5.1	Izliv vode iz cevi v vodočram (voda priteče iz VM 2)
5.2	Izliv vode iz cevi v vodočram (voda priteče iz VM 1)
10	Pipa zunaj hiše
12	Pipa v hiši
14	Mrtev rokav pri novogradnji
15	Pipa v objektu (redko v uporabi)
16	Mrtev rokav, pipa zunaj objekta
18	Pipa v hiši

Vseh 6 vzorčnih mest VS na Gorenjskem predstavljajo pipe v stanovanjskih objektih.

3.2.2 Nacepljanje vzorcev na gojišča

3.2.2.1 Vodovodni sistem na Dolenjskem

Za ocenitev mikrobiološkega stanja vode vzorčene dne 31.1.2008, smo $100 \mu\text{L}$ vzorca nacepili na gojišče MacConkey. Nato smo 100 mL vzorca prefiltrirali skozi sterilni membranski filter (premer 47 mm, Millipore) s premerom por $0,22 \mu\text{m}$ in filter s pinceto prenesli na gojišče mFC in oboje inkubirali 24 ur pri 37°C . Gojišči MacConkey in mFC sta selektivni gojišči, ki omogočata rast le po Gramu negativnim bakterijam. Bakterije, ki so fekalnega izvora, se na gojišče MacConkey obarvajo roza, na gojišču mFC pa modro ali roza.

Za ocenitev mikrobiološkega stanja vode, vzorčene dne 8.7.2008 in 15.10.2008 smo $100 \mu\text{l}$ vzorca nacepili na neselektivno gojišče (LB agar) v dveh ponovitvah in jih inkubirali 24 ur pri 37°C in 22°C . Za gojenje na gojiščih za preverjanje prisotnosti koliformnih bakterij (Chromocult® Coliform Agar – selektivno gojišče, ki omogoča rast le po Gramu negativnim bakterijam, koliformne bakterije se obarvajo modro in rdeče)) in enterokokov (Chromocult® Enterococci Agar-selektivno gojišče, ki omogoča rast le enterokokom) smo skozi membranske filtre (premer por $0,22 \mu\text{m}$) prefiltrirali 100 mL vzorca in nato filtre položili na gojišča. Oboje smo inkubirali 24 ur pri 37°C .

3.2.2.2 Vodovodni sistem na Gorenjskem

Pri obeh vzorčenjih smo 100 mL vzorcev prefiltrirali skozi membranske filtre (premer por $0,22 \mu\text{m}$), jih položili na gojišče MacConkey in inkubirali 24 ur pri 37°C .

3.2.3 Izolacija DNK

Za izolacijo DNK iz planktonskih bakterijskih združb smo 5 L vzorca filtrirali skozi filtre (TPP) s premerom por $0,2 \mu\text{m}$.

Za izolacijo DNK iz pritrjenih bakterijskih združb, smo vzorce centrifugirali 10 min pri $1000 \times g$, ker pa so se pri nekaterih vzorcih trdni delci ob odlivanju supernatanta dvigovali, smo vse vzorce centrifugirali še dodatnih 5 min pri istih obratih. Supernatant smo nato odlili, kar ga ni bilo mogoče odliti, pa smo ga odstranili s pipetiranjem. Za izolacijo smo vzeli $300 \mu\text{L}$ usedline, ostanek pa smo shranili na -80°C .

DNK smo izolirali po postopku proizvajalca testenga seta SmartHelix™ Nucleic Acid Extraction Kit (IFB, Slovenija).

3.2.4 Merjenje koncentracije izolirane DNK

Celokupno koncentracijo izolirane DNK smo izmerili s kompletom Quanti-It™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) in napravo Qubit™ fluorometer (Invitrogen) po navodilih proizvajalca.

3.2.5 Čiščenje DNK

Ker je bilo v vzorcih za izolacijo DNK iz biofilmov prisotnih veliko nečistoč, se jih mnogo ekstrahira z DNK. Ker nečistoče lahko motijo verižno reakcijo s polimerazo, smo jih odstranili s čiščenjem izolatov skozi kolone Sephadex.

Potek čiščenja:

- Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich) smo rehidrirali v sterilnem pufu HSTE in pustili, da je nabrekal tri dni, nato pa smo ga avtoklavirali
- nato smo trikrat spirali kroglice Sephadex-a G-100 v sterilnem pufu HSTE (pustili smo, da se kroglice posedejo in odlili tekočino, nato pa ponovno nalili nov pufer, premešali in pustili, da se kroglice spet posedejo)
- po zadnjem spiranju smo dodali toliko pufra HSTE, da je ta prekril kroglice Sephadexa, nato pa smo suspenzijo avtoklavirali
- 1 mL avtoklavirane suspenzije kroglic smo dali v 1mL injekcijsko brizgo v katero smo pred tem aseptično prenesli sterilno vato iz umetnih vlaken in jo z batom potisnili na dno injekcijske brizge
- kolone smo centrifugirali pri 1100 obr/min (130 x g), 10 minut, 8°C, da se je suspenzija kroglic zbila na dno, pufer pa je odtekel. Kolone smo polnili in centrifugirali tolikokrat, da smo dobili volumen kroglic približno 1 mL
- kolone smo nato še dvakrat sprali s 100 µL sterilnega pufra HSTE
- kolone smo namestili v centrifugirke, v katere smo predhodno namestili sterilne epice brez pokrovčkov
- potem smo po 100 µL vzorcev (30 µL izolata dodamo 70 µL sterilne MilliQ vode) nanesli na kolone in jih centrifugirali pri 130 g,10 minut, 8°C
- DNK smo nato trikrat izpirali s 100 µL pufra HSTE (centrifugirali pri 130 x g, 10 minut, 8°C)
- vzorec, ki se je nabral v epici na dnu centrifugirke, smo prenesli v sterilno epico s pokrovčkom in mu dodali ¼ skupnega volumna vzorca amonijevega acetata in 2x volumen 96 % ohlajenega etanola
- vzorce smo precipitirali 1 uro, nato pa smo jih centrifugirali pri 14 000 obr/min, 30 min, 4°C
- supernatant smo nato odpipetirali in dodali 750 µL 80 % etanola in centrifugirali 15 min, 14 000 obr/min, 4°C
- supernatant smo nato zopet odpipetirali in precipitat posušili ob ognju
- posušen precipitat smo raztopili v 30 µL sterilne MilliQ vode in ga shranili pri -80°C

3.2.6 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Pri verižni reakciji s polimerazo smo pomnoževali približno 450 bp dolg del gena za 16S rRNK. Za PCR pomnožke, ki smo jih potrebovali za TGGE, smo uporabil oligonukleotidna začetnika U986-GC in 1401r. PCR mešanica je za en vzorec vsebovala:

- 17,25 µL MilliQ vode
- 2,5 µL PCR pufra
- 1,5 µL MgCl₂ (25 mM)

- 1 µL oligonukleotidnega začetnika U986-GC ali U986 za reamplifikacijo (10pmol/µL)
- 1 µL oligonukleotidnega začetnika 1401r (10pmol/µL)
- 0,25 µL dNTP Mix (10 mM)
- 0,3 µL polimeraze
- 1 µL vzorca

Za vsak vzorec smo naredili tri ponovitve PCR reakcije, za reamplifikacijo izrezanih fragmentov iz TGGE gela pa dve ponovitvi PCR reakcije.

Program za PCR je bil:

- predhodna denaturacija (92°C, 3 min)
- 35 ciklov:
 - denaturacija (92°C, 30 sekund)
 - prileganje začetnih oligonukleotidov (54°C, 30 sekund)
 - pomnoževanje (68°C, 1 min)
- inkubacija ob zaključku programa (72°C, 10 min)
- ohlajanje na 4°C

3.2.7 Agarozna gelska elektroforeza

Uspešnost izvedbe PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Uporabili smo 1% agarozni gel. Nanj smo nanesli po 2 µL PCR produkta, ki smo mu dodali 1 µL 6X Loading Dye in 2 µL 1X Sybr Green (Fluka). Elektroforeza je potekala 30 min pri 100 V, nato pa smo gel pogledali pod UV svetlobo v transiluminatorju (BioDoc Analyze, Biometra).

3.2.8 Koncentriranje PCR produktov

PCR produkte smo skoncentrirali s posebnim sistemom (Millipore) po navodilih proizvajalca.

3.2.9 Temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE)

3.2.9.1 Gelska elektroforeza s temperaturnim gradientom pravokotnim na smer potovanja DNK fragmentov

Najprej smo pripravili model za vливanje gela po navodilih proizvajalca (Biometra)(plošči smo očistili z 70 % etanolom, na ploščo z distančniki smo nanesli Acryl Glide (Amresco, USA), na ravno ploščo pa Polybond folijo (Biometra), na ploščo z distančniki smo namestili silikonsko tesnilo ter plošči stisnili skupaj s sponami).

Mešanico za gel smo pripravili v merilnem valju. Vanj smo zatehtali 28,8 g uree, dodali 1,5 mL 50x pufra TAE, 3 mL 40% glicerola, 15 mL mešanice akrilamid : bisakrilamid (60:1), 12 mL formamida in dodali toliko MilliQ vode, da je končni volumen mešanice znašal 60 mL. Mešanico smo raztopili na magnetnem mešalu in s segrevanjem v topli kopeli. Ko se je vsa urea raztopila, smo mešanici dodali 102 µL TEMED in 180µL 10 %

amonijevega persulfata (APS). Premešano mešanico smo sfiltrirali skozi 0,22 µm sterilen filter (Sartorius), in jo med filtriranjem sproti točili v model za gel.

Po treh urah, ko se je gel strdil, smo model razdrli in gel prenesli na teflonsko folijo na TGGE MAXI System Controller (Biometra) tako, da je bila smer potovanja DNK vzorcev pravokotna na temperaturni gradient. Pred tem smo na teflonsko folijo nakapljali 1,5 mL 0,01% Tritona, potem pa gel prekrili s folijo. V banjice smo nalili po 500 mL 1,25x TAE pufra in vanj in na gel namestili krpici, ki smo jih prekuhalili v destilirani vodi. V jamico, ki tu poteka vzdolž celotnega gela, smo napipetirali mešanico vzorcev in TGGE barvila s skupnim volumnom 250 µL.

Program, po katerem je potekala gelska elektroforeza s pravokotnim temperaturnim gradientom je bil:

- 300 V, 10 min, pri 25 °C
- 0 V, 3 min, 30-60 °C (za pritrjene bakterijske združbe) ali 35-55°C (za planktonske bakterijske združbe)
- 300 V, 5 h, 30-60 °C ali 35-55°C

Gel smo barvali z 1X Sybr Green (Fluka) 30 minut v temi in ga fotografirali.

3.2.9.2 Gelska elektroforeza z vzdolžnim temperaturnim gradientom

Celoten postopek priprave gela, modela za vlivanje gela in nameščanje gela na TGGE MAXI System Controller (Biometra) je potekal enako kot za gelsko elektroforezo s pravokotnim temperaturnim gradientom, s to razliko, da smo sedaj namesto steklene plošče, ki ima nastavek za eno jamico skozi celotno širino plošče, uporabili ploščo, ki ima nastavke za 34 jamic. Ko smo gel namestili na napravo, smo v jamice odpipetirali po 8 µL vzorca, v vsako šesto jamico smo namesto vzorca dodali 5 µL standarda (DNA/PstI Marker, 24 (Fermentas, Litva). V tiste jamice, ki pa so ostale prazne, pa smo odpipetirali 5 µL barvila TGGE.

Program, po katerem je potekal TGGE:

- 300 V, 10 min, pri 25 °C
- 0 V, 3 min, pri izbranem temperaturnem gradientu
- 220 V, 16 h, 40-49 °C (za pritrjene bakterijske združbe), 41-48°C (za planktonske bakterijske združbe iz VS V. Loka) ali 42-48°C (za planktonske bakterijske združbe iz Železnikov)

Po končanem programu smo gel pobarvali po že opisanem postopku, ga pogledali pod UV-lučjo in fotografirali. Jasno razvidne fragmente smo na foliji označili s flomastrom, jih izrezali s sterilnim skalpelom in dali v epice.

V epice s fragmenti, ki smo jih želeli reamplificirati smo dodali 50 µL MilliQ vode, jih narahlo stresali in na kratko centrifugirali. Nato smo jih postavili za 24 ur v hladilnik pri 4°C (ostale epice smo shranili pri -20°C). Po 24 urah smo tako raztopljeno DNK v primernih redčitvah uporabili za reamplifikacijo.

Analizo slik in izris dendrogramov smo izvedli s programom BioDoc Analyze 2.1 (Biometra). Dendrograme smo izrisali samo za vzorčna mesta na Dolenjskem. Za izris smo uporabili neobteženo metodo parnih skupin z aritmetično sredino (UPGMA), podobnostne koeficiente smo izračunali na podlagi Pearsonove korelacije denzitometričnih krivulj med vzorčnimi mesti.

3.2.10 Analiza 16S rRNA nukleotidnih zaporedij

Sekvenciranje reamplificiranih fragmentov je opravilo podjetje Macrogen (Južna Koreja). Kvalitetne sekvence smo taksonomsko uvrstili z orodjem Seqmatch v bazi podatkov RDP 10 (Ribosomal Database Project). Za vsako našo sekvenco smo poiskali 5 filogenetsko najbolj sorodnih sekvenc in jih shranili ter jih vključno z našimi sekvencami obdelali s programom Bioedit (Hall, 1999) in programskim paketom MEGA 4.0 (Tamura in sod., 2007). Filogenetska drevesa smo izrisali z metodo povezovanja sosedov (Neighbour-joining) na podlagi Kimurinega dvoparametričnega modela, kvaliteto dreves pa smo ocenili z metodo vezanja (bootstrap) pri 1000 ponovitvah.

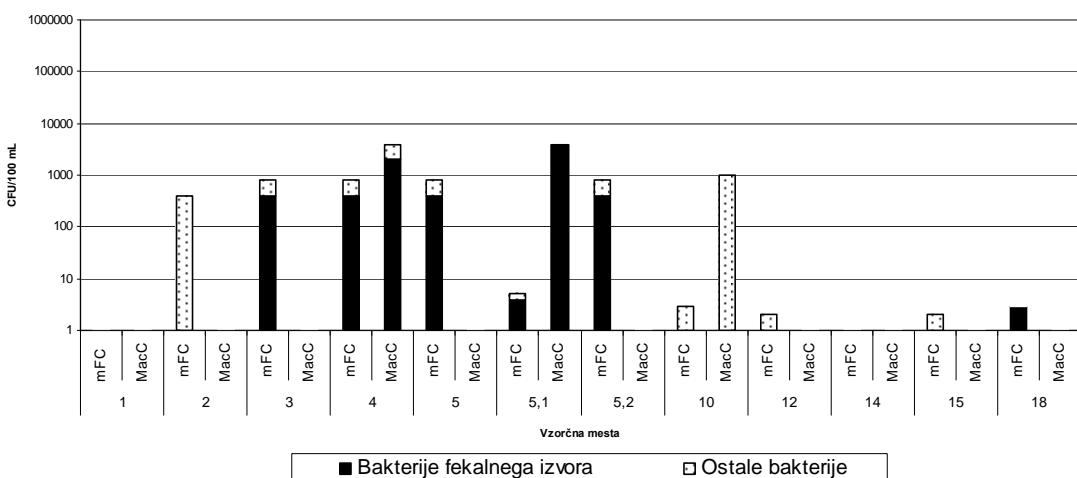
4 REZULTATI

4.1 RAST PLANKTONSKIH BAKTERIJ NA GOJIŠČIH

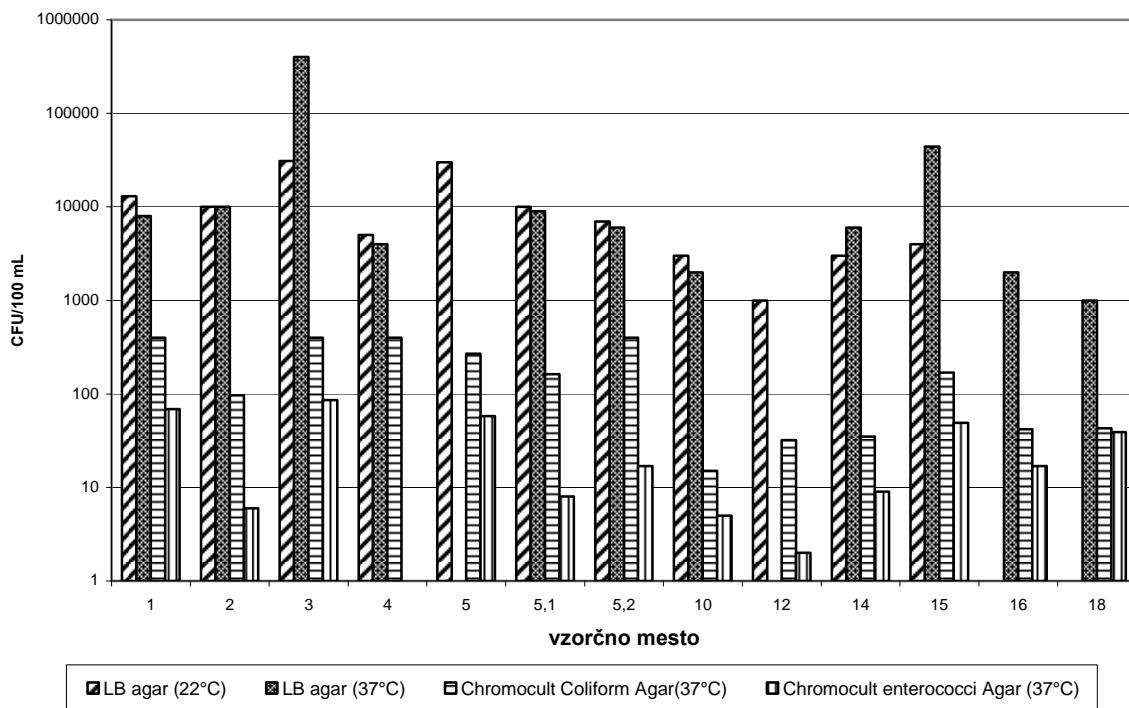
Koliformne bakterije so bile prisotne v VS na Dolenjskem ob vsakem vzorčenju. Julija (slika 3) in oktobra (slika 4) so bile prisotne na vseh vzorčnih mestih (razen oktobra na VM 10), tudi na vseh izvirih. Oktobra jih je bilo največ na VM 1 in VM 4, kjer so bila gojišča preraščena (več kot 400 CFU), julija pa so bila taka VM 1, VM 3, VM 4 in VM 5.2. Število kolonij na končnih točkah VS je bilo manjše kot na izvirih. Januarja (slika 2) so bile koliformne bakterije prisotne na petih vzorčnih mestih. Največ jih je bilo na VM 5.1 (4000 CFU/100 mL), od izvirov pa so bile prisotne samo na VM 3. Prisotne so bile tudi na končni točki vodovoda na VM 18 (3 CFU/100 mL), v mrtvih rokavih pa jih ni bilo zaslediti. Kljub temu, da sta obe gojišči, ki smo ju uporabili, selektivni za bakterije fekalnega izvora, se je število kolonij za ista vzorčna mesta razlikovalo. Le na VM 1 in VM 14 nismo prikazali prisotnost fekalnih bakterij.

V VS na Gorenjskem fekalnih bakterij aprila nismo zasledili na nobenem vzorčnem mestu, januarja pa na treh, od tega je bilo največje število na VM 6, in sicer 4 CFU/100 mL (slika 5).

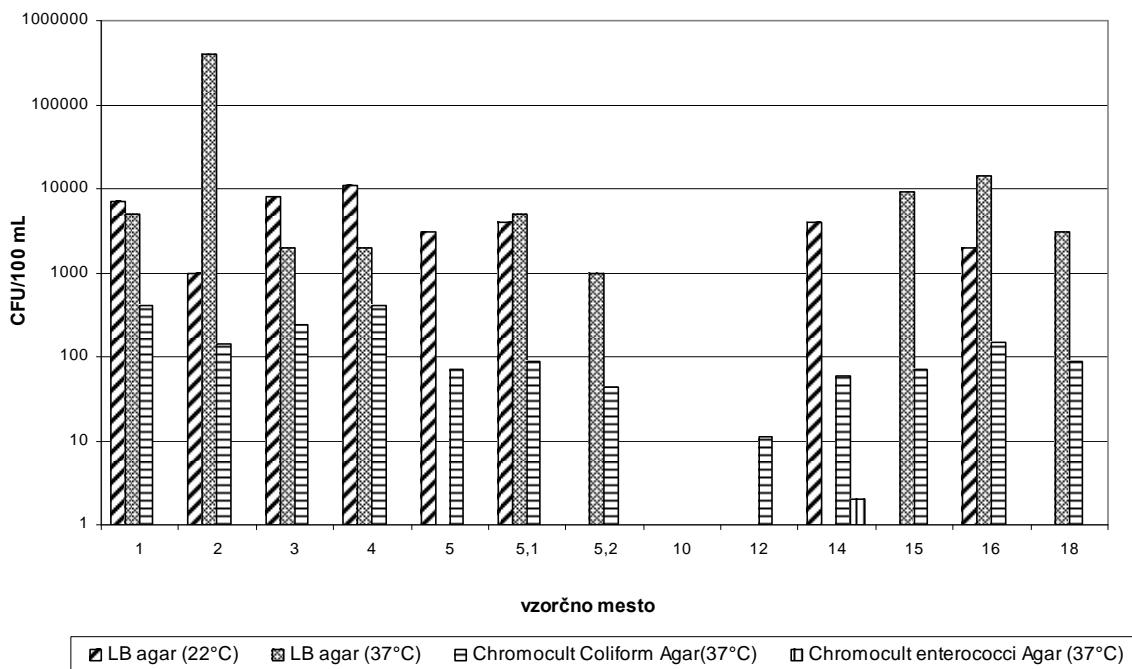
V VS na Dolenjskem smo preverjali tudi prisotnost heterotrofnih bakterij, in sicer z gojenjem na LB agarju, ki je neselektivno gojišče. Nacepljene vzorce smo inkubirali pri 22°C in 37°C. Mejne vrednosti za oba parametra določena z zakonodajo sta manj kot 100 CFU/ml (Pravilnik o pitni vodi, 2004). Število kolonij pri 22°C je julija na izvirih in v vodoohramu (VM 5) presegalo mejne vrednosti, toda že na naslednjem vzorčnem mestu se je število kolonij zmanjšalo pod mejno vrednost in je z oddaljenostjo vzorčnih mest od izvirov le še padalo. Število kolonij pri 37°C (mejna vrednost pod 100 CFU/mL), se ni bistveno razlikovalo od števila kolonij pri 22°C, razen na VM 15 kjer je bilo 10-krat večje. Po oktobrskem kloriranju je število kolonij padlo pod mejno vrednost na vseh vzorčnih mestih, razen na VM 2 in VM 16 pri 37°C.



Slika 2: Število CFU/100 mL na agarju mFC in gojišču MacConkey po vzorčnih mestih za januar v VS na Dolenjskem (mFC- agar mFC, MacC- gojišče MacConkey)

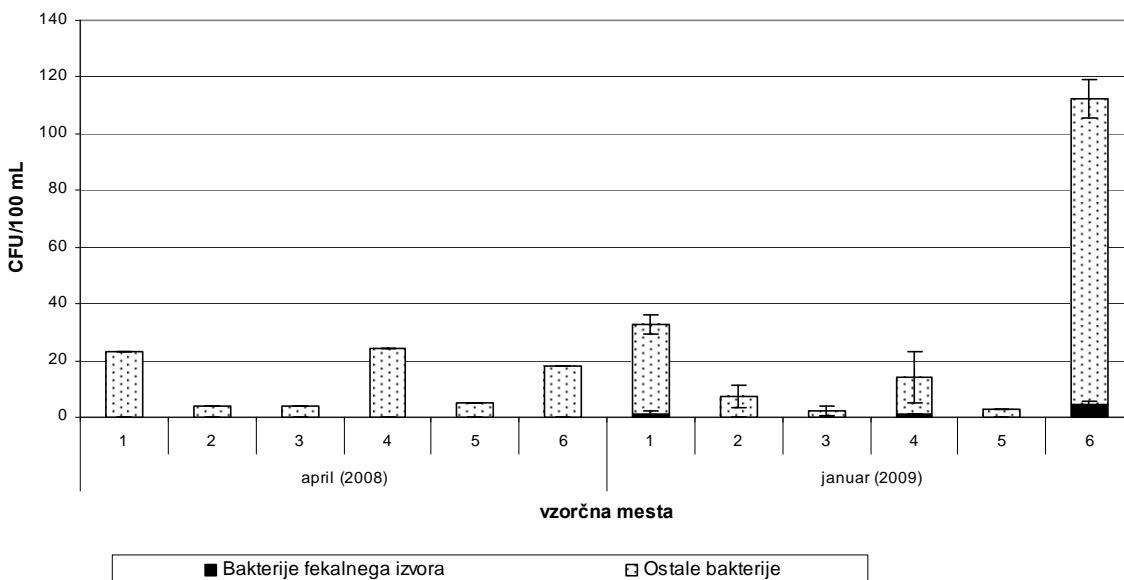


Slika 3: Število CFU/100 mL za različna gojišča za julij v VS na Dolenjskem.



Opomba: Pri gojenju vzorca iz VM 10 je prišlo do napake pri gojenju na Chromocult Coliform Agarju in pri vz. mestu 18 pri gojenju na LB agarju na 22°C.

Slika 4: Število CFU/100 mL za različna gojišča za oktober v VS na Dolenjskem



Slika 5: Število CFU/100 mL pri gojenju na gojišču MacConkey v VS na Gorenjskem

4.2 REZULTATI IDENTIFIKACIJE BAKTERIJ V VODOVODNEM SISTEMU Z MOLEKULARNO-BIOLOŠKIMI METODAMI

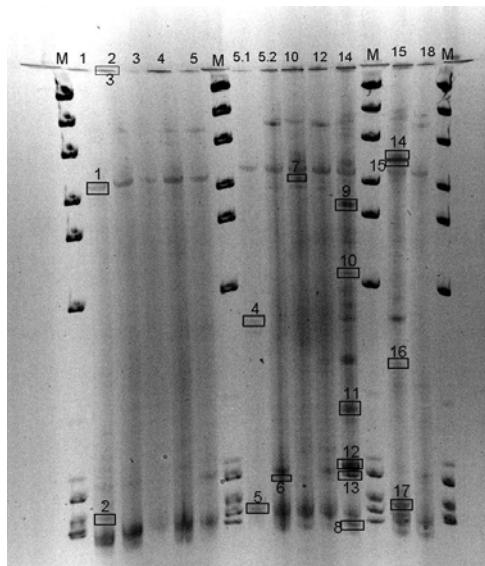
TGGE smo izvedli zato, da smo lahki primerjali profil bakterijske združbe med vzorčnimi mesti in različnimi letnimi časi ter tudi z namenom taksonomsko določiti, katere bakterije so prisotne v VS. To smo storili tako, da smo izrezali, reamplificirali in sekvencirali fragmente, ki so bili na TGGE gelih najbolj vidni, saj ti predstavljajo tiste bakterije, ki so najbolj zastopane v bakterijski združbi. Sekvenciranje vseh reamplificiranih fragmentov ni bilo uspešno, saj smo pri nekaterih dobili sekvence slabe kakovosti. Fragmenti, katerih sekvence so bile dovolj kakovostne za nadaljnjo uporabo, so z okvirčki označeni na slikah 6 do 12, v preglednicah 4 do 10 pa so zapisane taksonomske uvrstitve teh fragmentov in njihovi najbližji sorodniki, določeni z vrednostjo p-razlike (izračunali smo jo s programskim paketom MEGA 4.0). p-razlika je ob primerjavi dveh zaporedij delež nukleotidnih mest, kjer se pojavijo različni nukleotidi. Sekvence smo uvrstili v rod, če je bila p-razlika manjša od 0,03 (Vandamme in sod., 1996).

Sekvence, pridobljene iz VS na Dolenjskem pripadajo 7 debлом bakterij (*TM7*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Firmicutes*), nekaj pa jih je bilo sorodnih z bakterijami, ki še niso uvrščene v taksonomski sistem. Zastopanost posameznih skupin bakterij se je med planktonskimi in pritrjenimi združbami razlikovala, prav tako pa se je razlikovala med vzorčenji. Edina skupina bakterij, ki je bila vedno prisotna je razred *Gammaproteobacteria*.

Če pogledamo samo planktonske bakterijske združbe v VS na Dolenjskem, smo na izvirih pri vseh treh vzorčenjih (slike 6-8, preglednice 4-6) zasledili le bakterije iz razreda *Gammaproteobacteria*, na ostalih vzorčnih mestih pa so bile prisotne tudi bakterije iz drugih skupin. Izmed vseh bakterij, ki smo jih zasledili, le za eno lahko trdimo, da je

prisotna v celotnem vodovodnem sistemu. Gre za bakterijo, ki smo jo uvrstili v rod *Methylobacter*, na gelu jo predstavlja fragment z oznako 1 (1-2 VLPL jan), njen najbližji sorodnik pa je nekultivabilna bakterija FukuN13. Da je bakterija prisotna v celotnem vodovodnem sistemu, sklepamo iz mesta nahajanja fragmentov na gelu, saj so vsi v istem pasu kot 1-2 VLPL jan. Pri ostalih fragmentih, ki smo jih uspešno sekvencirali, je bilo pojavljanje v istih pasovnih redko opaženo. Ostale bakterije, ki smo jih določili, se med vzorčnimi mestci in tudi med vzorčenji razlikujejo. Podobno smo opazili tudi pri sekvencah, ki smo jih pridobili iz planktonskih bakterijskih združb iz VS na Gorenjskem (slika 12, preglednica 10). Sekvence pridobljene aprila 2008 smo uvrstili v razrede *Alpha-*, *Beta-* in *Deltaproteobacteria* ter deblo *Chlamydiae*, nekaj sekvenc pa je bilo sorodnih z bakterijami, ki še niso uvrščene v taksonomski sistem. Januarja 2009 so bile prisotne še bakterije, katerih sekvence pripadajo predstavnikom razreda *Gammaproteobacteria* in debla *Acidobacteria*. Predstavniki bakterij, ki smo jih določili so zelo različni, edino dve sekvenci smo uspeli uvrstiti v isti rod oz. sta imeli istega sorodnika (oznaka fragmentov 139 in 140).

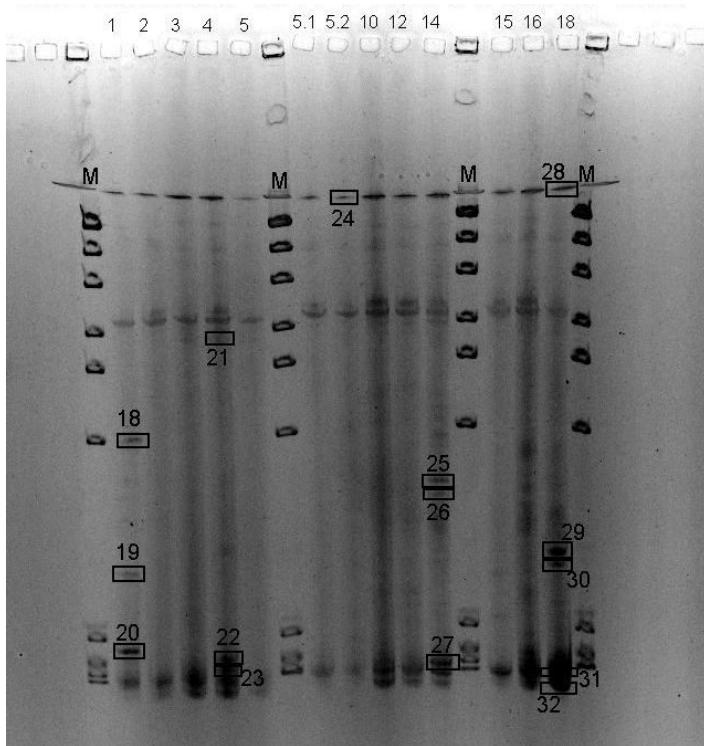
Sekvence, ki smo jih pridobili iz pritrjenih bakterijskih združb v VS na Dolenjskem (slike 9-11, preglednice 7-9), so imele druge sorodnike kot sekvence iz planktonskih združb. Tudi zastopanost po deblih se je razlikovala. Na izvirih smo poleg razreda *Gammaproteobacteria* (edini prisoten pri planktonskih združbah), ugotovili še prisotnost bakterij iz razredov *Alfa-* in *Betaproteobacteria* ter debel *Actinobacteria* in *Firmicutes*. Sorodniki pridobljenih sekvenc se med vzorčnimi mestci razlikovali, pri nekaterih pa se iz slike gela vidi, da se pojavljajo v istih pasovih. Nekatere sekvence iz istih vzorčih mest imajo iste najbližje sorodnike, kar je posledica prisotnosti več kopij gena za 16S rRNK v istem organizmu. Taki primeri so na sliki 9 na VM 2 fragmenti z oznakami 41, 44-46 in 42-43, na sliki 10 fragmenti z oznakami 74-77 in na sliki 11 fragmenti z oznakam 102-104. Tudi pri nekaterih ostalih vzorčenjih in vzorčnih mestih je prišlo do podobnega pojava, pogosteje pa se je zgodilo da smo sekvence uvrstili le v isti rod, niso pa imele istih sorodnikov. Tak primer sta sekvenci 64 in 65 na sliki 9, ki smo jih uvrstili v rod *Acinetobacter*. Med vzorčenji in tudi vzorčnimi mestci smo opazili, da se spremeninja zastopanost taksonomskih skupin, če pa te ostanejo iste, pa so prisotni drugi filotipi znotraj iste skupine.



Slika 6: TGGE gel s profilom fragmentov iz planktonskih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem

Preglednica 4: Taksononska uvrstitev sekvenciranih fragmentov iz planktonskih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
1	1-2 VLPL jan	rod <i>Methylobacter</i>	uncultured bacterium FukuN13; AJ290055	0,0208
2	1-4 VLPL jan	rod <i>Methylobacter</i>	uncultured bacterium FukuN13; AJ290055	0.0135
3	2-1 VLPL jan	rod <i>Methylobacter</i>	uncultured bacterium FukuN13; AJ290055	0.0203
4	5.1-2 VLPL jan	unclassified Bacteria	uncultured bacterium; SDKAS1_13; AY734241	0.0419
5	5.1-3 VLPL jan	unclassified Bacteria	uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0471
6	5.2-4 VLPL jan	rod <i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i> sp. BF101; AM934680	0.0107
7	10-2 VLPL jan	družina <i>Incertae sedis</i> 5	<i>Leptothrix cholodnii</i> ; CCM 1827; X97070	0.0033
8	14-11 VLPL jan	družina <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured bacterium; p5h12ok; FJ478604	0.0274
9	14-2 VLPL jan	unclassified <i>Actinomycetales</i>	uncultured actinobacterium; NO3; AJ575556	0.0029
10	14-3 VLPL jan	unclassified <i>Actinomycetales</i>	uncultured actinobacterium; FNE11-3; DQ316345	0.0401
11	14-7 VLPL jan	unclassified <i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiales</i> bacterium CRIB 32; EU363464	0.0687
12	14-8 VLPL jan	unclassified <i>Actinomycetales</i>	uncultured actinobacterium; NO3; AJ575556	0.0068
13	14-9 VLPL jan	unclassified <i>Actinomycetales</i>	uncultured actinobacterium; ST11-10; DQ316356	0.0085
14	15-4 VLPL jan	Unclassified <i>Rhizobiales</i>	uncultured bacterium; 1.4.8; EU528259	0.0448
15	15-5 VLPL jan	Unclassified <i>Rhizobiales</i>	AF364838	0.0796
16	15-8 VLPL jan	družina <i>Oceanospirillaceae</i>	<i>Oceanospirillum</i> sp. ME101; AJ302699	0.0442
17	15-9 VLPL jan	unclassified <i>Rhizobiales</i>	uncultured bacterium; 1.4.8; EU528259	0.0394



Slika 7: TGGE gel s profilom fragmentov iz planktonskih bakterijskih združb izoliranih julija iz VS na Dolenjskem

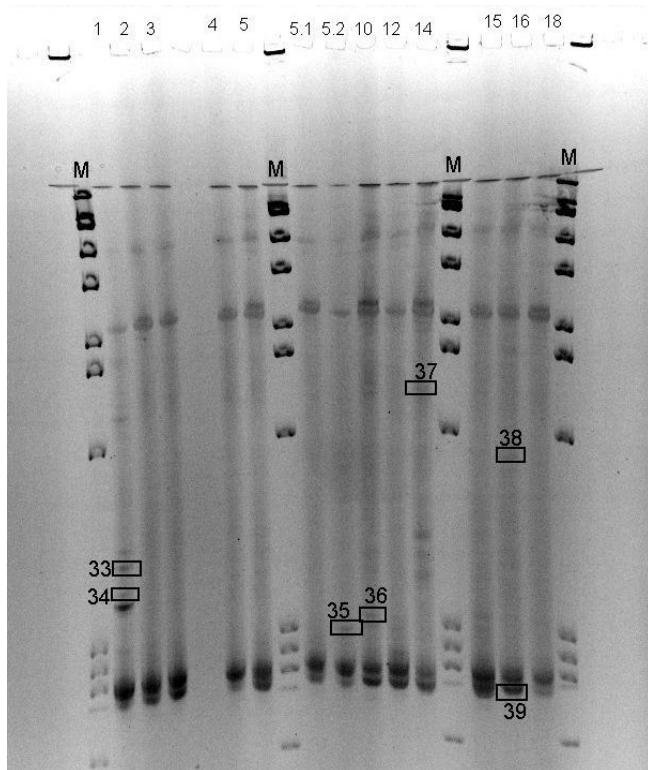
Preglednica 5: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov iz planktonskih bakterijskih združb izoliranih julija iz VS na Dolenjskem

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
18	1-2 VLPL jul	unclassified <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Hafnia alvei sensu stricto genomosp.</i> 1; FM179942	0.0000
19	1-3 VLPL jul	rod <i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium; nbt176a05; EU534472	0.0060
20	1-4 VLPL jul	družina <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter sp.</i> 3242; DQ923475	0.0058
21	4-4 VLPL jul	rod <i>Methylobacter</i>	uncultured bacterium; LO13.6; AF358020	0.0107
22	4-5 VLPL jul	rod <i>Methylobacter</i>	uncultured bacterium; LO13.6; AF358020	0.0127
23	4-6 VLPL jul	rod <i>Methylobacter</i>	uncultured bacterium; LO13.6; AF358020	0.0492
24	5.2-1 VLPL jul	razred <i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pasteurella sp.</i> MCCM 02120; AF224304	0.0667
25	14-2 VLPL jul	TM7 genera incertae sedis	uncultured bacterium; Elev 16S 1230; EF019868	0.0174
26	14-3 VLPL jul	TM7 genera incertae sedis	uncultured bacterium; Elev 16S 1230; EF019868	0.0174
27	14-4 VLPL jul	TM7 genera incertae sedis	uncultured bacterium; Elev 16S 1230; EF019868	0.0174
28	18-1 VLPL jul	unclassified <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0033

se nadaljuje

nadaljevanje

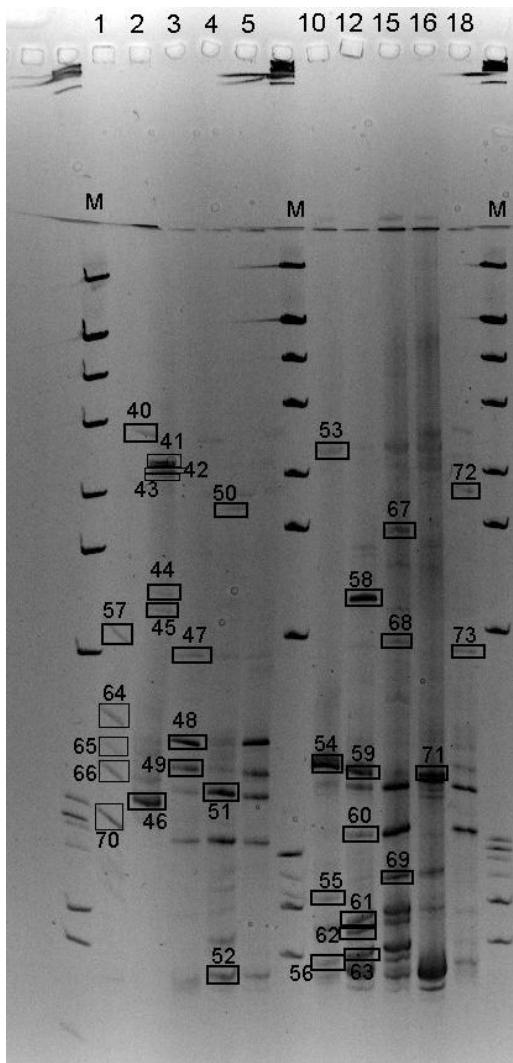
Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
29	18-2 VLPL jul	unclassified <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000
30	18-3 VLPL jul	unclassified <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000
31	18-4 VLPL jul	unclassified <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000
32	18-5 VLPL jul	unclassified <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000



Slika 8: TGGE gel s profilom fragmentov iz planktonskih bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem

Preglednica 6: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov iz planktonskih bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
33	1-3 VLPL okt	družina <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Hafnia alvei</i> ; k 43; AY253922	0.0084
34	1-4 VLPL okt	družina <i>Enterobacteriaceae</i>	uncultured bacterium; XW117; AY941836	0.0100
35	5.2-2 VLPL okt	rod <i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium; nbt106a10; EU539840	0.0134
36	10-4 VLPL okt	družina <i>Rhodocyclaceae</i>	uncultured bacterium; A14; FJ660543	0.0331
37	14-2 VLPL okt	družina <i>Gallionellaceae</i>	<i>Gallionella ferruginea</i> (T); L07897	0.0440
38	16-1 VLPL okt	rod <i>Janthinobacterium</i>	<i>Aquaspirillum arcticum</i> ; IAM 14963; AB074523	0.0000
39	16-3 VLPL okt	družina <i>Oxalobacteraceae</i>	uncultured bacterium; BF0001B010; AM696984	0.0092



Slika 9: TGGE gel s profilom fragmentov iz pritrjenih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem

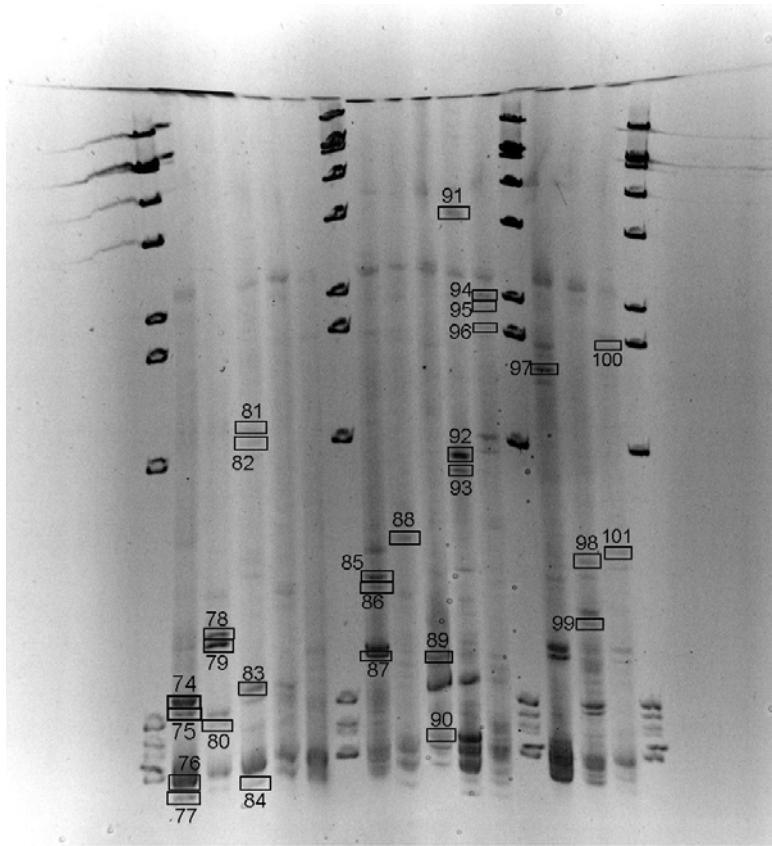
Preglednica 7: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov iz pritrjenih bakterijskih združb izoliranih januarja iz VS na Dolenjskem

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
40	1-1 VLBF jan	rod <i>Staphylococcus</i>	uncultured bacterium; nbu58a01c1; GQ003838	0.0000
41	2-1 VLBF jan	rod <i>Atopostipes</i>	<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0027
42	2-2 VLBF jan	rod <i>Atopostipes</i>	<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005050	0.0027
43	2-3 VLBF jan	rod <i>Atopostipes</i>	<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005050	0.0027
44	2-4 VLBF jan	rod <i>Atopostipes</i>	<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0054
45	2-5 VLBF jan	rod <i>Atopostipes</i>	<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0062
46	2-7 VLBF jan	rod <i>Atopostipes</i>	<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0033
47	3-1 VLBF jan	rod <i>Enhydrobacter</i>	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (T); type strain: LMG 21877 = ATCC 27094; AJ550856	0.0029
48	3-2 VLBF jan	rod <i>Enhydrobacter</i>	<i>Moraxella</i> (<i>Moraxella</i>) osloensis; 5873; AF005190	0.0060
49	3-3 VLBF jan	rod <i>Acinetobacter</i>	uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; S15A-MN113; AJ534674	0.0082
50	4-1 VLBF jan	rod <i>Gp8</i>	uncultured <i>Acidobacteria bacterium</i> ; S15A-MN55; AJ534690	0.0047
51	4-3 VLBF jan	družina <i>Rhizobiaceae</i>	uncultured <i>Agrobacterium sp.</i> ; VOTO1-F; EF554922	0.0087
52	4-6 VLBF jan	razred <i>Actinobacteria</i>	uncultured bacterium; BF0001C091; AM697250	0.1020
53	10-1 VLBF jan	družina <i>Acidobacteriaceae</i>	uncultured <i>Pietermaritzburg bacterium</i> Y14-5; AF312219	0.0657
54	10-2 VLBF jan	rod <i>Gp4</i>	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
55	10-4 VLBF jan	unclassified <i>Chromatiales</i>	uncultured bacterium; HB1; EF648015	0.0453
56	10-6 VLBF jan	rod <i>Modestobacter</i>	<i>Geodermatophilus</i> ; 33S, limestone, Negev desert, Israel; X92362	0.0111
57	1-2 VLBF jan	rod <i>Enhydrobacter</i>	<i>Moraxella</i> (<i>Moraxella</i>) <i>osloensis</i> ; Ben 58; X95304	0.0000
58	12-1 VLBF jan	rod <i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (T); ATCC13883T; Y17656	0.0067
59	12-2 VLBF jan	rod <i>Gp4</i>	uncultured <i>Pietermaritzburg bacterium</i> Y14-5; AF312219	0.0000
60	12-4 VLBF jan	družina <i>Enterobacteriaceae</i>	uncultured bacterium; cc116; DQ057366	0.0029
61	12-5 VLBF jan	rod <i>Phenylobacterium</i>	drinking water bacterium Y7; AY328814	0.0099
62	12-6 VLBF jan	unclassified <i>Rhizobiales</i>	uncultured <i>alpha proteobacterium</i> CRIB-04; DQ123621	0.0121
63	12-7 VLBF jan	družina <i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus</i> ; B-SWPS, rock varnish, Mojave desert, USA; X92363	0.0298
64	1-3 VLBF jan	rod <i>Acinetobacter</i>	uncultured <i>Acinetobacter sp.</i> ; Lupin-1130m-1-MDA-ac1; EF205268	0.0081
65	1-4 VLBF jan	rod <i>Acinetobacter</i>	uncultured <i>Acinetobacter sp.</i> ; 3P-4-1-H15; EU706116	0.0197
66	1-5 VLBF jan	družina <i>Rhizobiaceae</i>	AF364837	0.0330

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
67	15-3 VLBF jan	rod <i>Legionella</i>	<i>Legionella-like amoebal pathogen 14; LLAP-14; U66104</i>	0.0056
68	15-4 VLBF jan	družina <i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Parachlamydia acanthamoebiae (T); Bn9; Y07556</i>	0.0928
69	15-8 VLBF jan	družina <i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter sp. LW4; FM956479</i>	0.0435
70	1-6 VLBF jan	družina <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter sp. g1; DQ923474</i>	0.0033
71	16-3 VLBF jan	rod <i>Methylobacterium</i>	<i>Methylobacterium sp. P1; AF148859</i>	0.0033
72	18-1 VLBF jan	rod <i>Staphylococcus</i>	human oral bacterium C20; AF202011	0.0064
73	18-2 VLBF jan	red <i>Pseudomonadales</i>	uncultured <i>Acinetobacter sp.; GI3-S-1-B08; FJ191708</i>	0.0064



Slika 10: TGGE gel s profilom fragmentov iz pritrjenih bakterijskih združb izoliranih julija iz VS na Dolenjskem

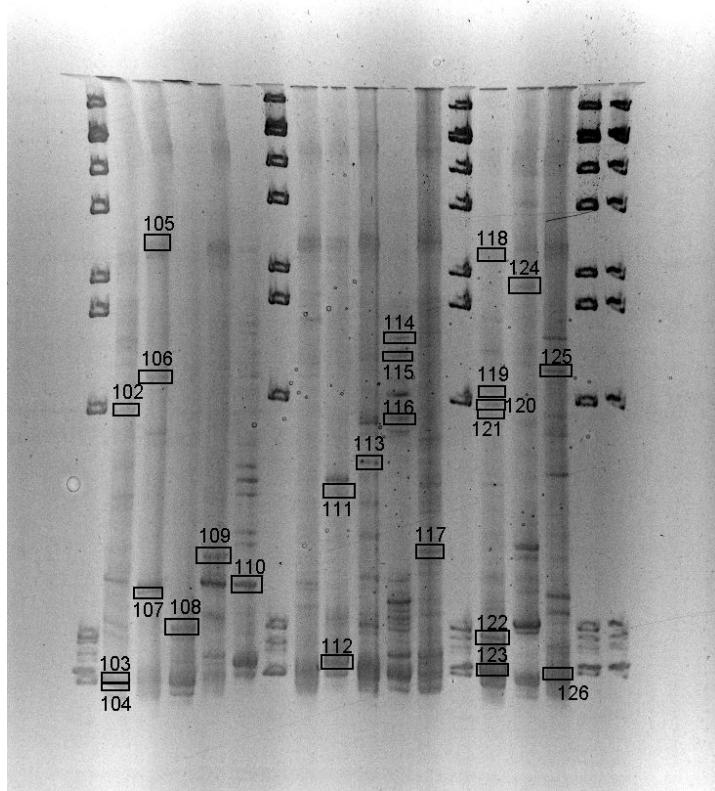
Preglednica 8: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov iz pritrjenih bakterijskih združb izoliranih julija iz VS na Dolenjskem

Oznaka fragmentov na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
74	1-1 VLBF jul	rod <i>Thermicanus</i>	uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1825; EU638332	0.0196
75	1-2 VLBF jul	rod <i>Thermicanus</i>	uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1825; EU638332	0.0397
76	1-3 VLBF jul	družina <i>Incertae Sedis X</i>	uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1825; EU638332	0.1569
77	1-4 VLBF jul	rod <i>Thermicanus</i>	uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1825; EU638332	0.0145
78	2-1 VLBF jul	rod <i>Phyllobacterium</i>	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ; AY512821	0.0027
79	2-2 VLBF jul	rod <i>Phyllobacterium</i>	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ; AY512821	0.0028
80	2-4 VLBF jul	rod <i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acnes</i> ; M61903	0.0000
81	3-1 VLBF jul	rod <i>Polaromonas</i>	uncultured bacterium; PIC-D9; AB252082	0.0103
82	3-2 VLBF jul	rod <i>Acidovorax</i>	uncultured <i>Acidovorax sp.</i> ; 11.2-15; AJ543435	0.0000
83	3-3 VLBF jul	unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	uncultured Oxalobacteraceae bacterium; Amb_16S_1500; EF018981	0.0000
84	3-7 VLBF jul	unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	uncultured soil bacterium; 99; AY493947	0.0000
85	5.1-4 VLBF jul	rod <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; AB073312	0.0116
86	5.1-5 VLBF jul	rod <i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium; P6D102-554; EF510106	0.0027
87	5.1-7 VLBF jul	rod <i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium; P6D102-554; EF510106	0.0000
88	5.2-1 VLBF jul	rod <i>Rhabdochlamydia</i>	uncultured <i>Candidatus Rhabdochlamydia sp.</i> ; CN554; EU090707	0.0516
89	10-2 VLBF jul	rod <i>Gp4</i>	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
90	10-4 VLBF jul	unclassified <i>Chromatiales</i>	uncultured bacterium; HB1; EF648015	0.0058
91	12-1 VLBF jul	rod <i>Chryseobacterium</i>	uncultured <i>Chryseobacterium sp.</i> ; GR2-36; DQ847444	0.0028
92	12-2 VLBF jul	rod <i>Aerococcus</i>	uncultured bacterium; BF0002B069; AM697119	0.0056
93	12-3 VLBF jul	rod <i>Aerococcus</i>	uncultured bacterium; obob2_aaa04c12; EF096525	0.0390
94	14-2 VLBF jul	družina <i>Incertae sedis 5</i>	uncultured bacterium; 110ds10; AY212562	0.0000
95	14-3 VLBF jul	družina <i>Incertae sedis 5</i>	uncultured bacterium; LO13.11; AF358003	0.0000
96	14-4 VLBF jul	rod <i>Acidovorax</i>	<i>Acidovorax facilis</i> (T); CCUG 2113; AF078765	0.0108

se nadaljuje

nadaljevanje

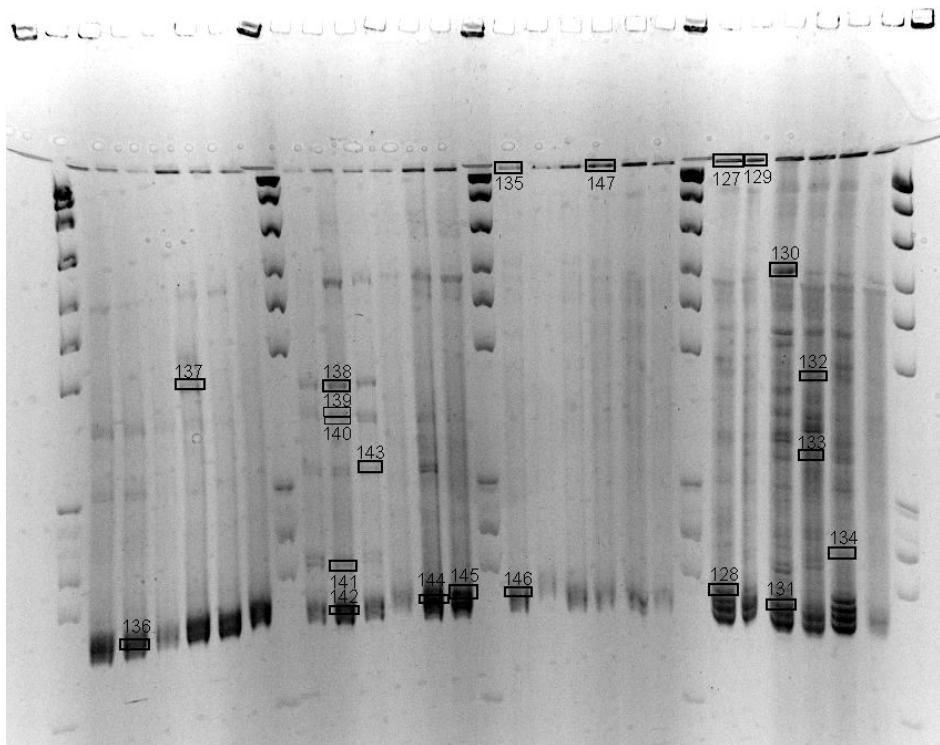
Oznaka fragmentov na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
97	15-3 VLBF jul	družina <i>Incertae sedis</i> 5	<i>Leptothrix cholodnii</i> ; CCM 1827; X97070	0.0000
98	16-2 VLBF jul	družina <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured sludge bacterium A37; AF234753	0.0039
99	16-4 VLBF jul	rod <i>Agrococcus</i>	<i>Corynebacterium cf. aquaticum</i> V4.BO.26; V4.BO.26 = MM_2933; AJ244681	0.0112
100	18-2 VLBF jul	družina <i>Comamonadaceae</i>	uncultured <i>Delftia</i> sp.; GI3-S-1-H03; FJ191754	0.0138
101	18-3 VLBF jul	unclassified <i>Comamonadaceae</i>	<i>Brachymonas petroleovorans</i> ; CHX; AY275432	0.0000



Slika 11: TGGE gel s profilom fragmentov iz pritrjenih bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem

Preglednica 9: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov iz bakterijskih združb izoliranih oktobra iz VS na Dolenjskem

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
102	1-1 VLBF okt	rod <i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus yeei</i> ; AY528674	0.0060
103	1-3 VLBF okt	rod <i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus yeei</i> ; AY528674	0.0031
104	1-4 VLBF okt	rod <i>Paracoccus</i>	<i>Paracoccus yeei</i> ; AY528674	0.0000
105	2-1 VLBF okt	red <i>Pseudomonadales</i>	<i>Acinetobacter parvus</i> (T); LUH4616 (Aci602); AJ293691	0.0833
106	2-3 VLBF okt	rod <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae bacterium E7</i> ; AF539761	0.0057
107	2-5 VLBF okt	rod <i>Rheinheimera</i>	<i>Rheinheimera baltica</i> ; OS 140; Baltic # 166; AJ002006	0.0172
108	3-1 VLBF okt	rod <i>Caulobacter</i>	uncultured bacterium; 654987; DQ404656	0.0032
109	4-1 VLBF okt	rod <i>Massilia</i>	uncultured bacterium; G4; AY706415	0.0000
110	5-7 VLBF okt	rod <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonadaceae bacterium E7</i> ; AF539761	0.0000
111	5.2-4 VLBF okt	rod <i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium; KRA30-19; AY081990	0.0035
112	5.2-5 VLBF okt	rod <i>Pseudomonas</i>	uncultured bacterium; nbt77b11; EU537350	0.0030
113	10-2 VLBF okt	unclassified <i>Microbacteriaceae</i>	<i>Salinibacterium sp.</i> 18III/A01/077; AY576726	0.0000
114	12-1 VLBF okt	rod <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> ; DSM 30008; X81667	0.0111
115	12-3 VLBF okt	rod <i>Staphylococcus</i>	uncultured bacterium; nbu115h04c1; GQ017094	0.0047
116	12-5 VLBF okt	rod <i>Aerococcus</i>	<i>Aerococcus viridans</i> ; 37R; AY707773	0.0143
117	14-1 VLBF okt	rod <i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus sp.</i> MBIC01430; MBIC 01430; AB088667	0.0096
118	15-1 VLBF okt	unclassified <i>Gammaproteobacteria</i>	uncultured bacterium; P9X2b3D10; EU491124	0.0314
119	15-2 VLBF okt	red <i>Legionellales</i>	uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; ADK-BTe02-89; EF520560	0.0378
120	15-3 VLBF okt	rod <i>Legionella</i>	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 14; LLAP-14; U66104	0.0056
121	15-4 VLBF okt	rod <i>Legionella</i>	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 14; LLAP-14; U66104	0.0031
122	15-5 VLBF okt	rod <i>Legionella</i>	uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; ADK-BTe02-89; EF520560	0.0112
123	15-6 VLBF okt	unclassified <i>Gammaproteobacteria</i>	uncultured bacterium; P9X2b3D10; EU491124	0.0288
124	16-1 VLBF okt	rod <i>Agrococcus</i>	<i>Corynebacterium cf. aquaticum</i> V4.BO.26; V4.BO.26 = MM_2933; AJ244681	0.0034
125	18-2 VLBF okt	družina <i>Incertae sedis</i> 5	uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; B-N19; AY622246	0.0000
126	18-6 VLBF okt	rod <i>Aquabacterium</i>	uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; B-N19; AY622246	0.0245



Slika 12: TGGE gel s profilom fragmentov iz planktonskih bakterijskih združb izoliranih iz VS na Gorenjskem aprila 2008 in januarja 2009

Preglednica 10: Taksonomska uvrstitev sekvenciranih fragmentov planktonskih bakterijskih združb izoliranih iz VS na Gorenjskem aprila 2008 in januarja 2009

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
127	1-1 ZEL apr	unclassified <i>Alphaproteobacteria</i>	uncultured bacterium; SWB03; AB294314	0.0475
128	1-8 ZEL apr	unclassified Bacteria	uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0481
129	2-1 ZEL apr	unclassified <i>Alphaproteobacteria</i>	uncultured bacterium; SWB03; AB294314	0.0268
130	3-2 ZEL apr	unclassified <i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiales bacterium CRIB 32</i> ; EU363464	0.0325
131	3-14 ZEL apr	unclassified Bacteria	uncultured bacterium; Biofilm 256d c16; DQ058677	0.0506
132	4-6 ZEL apr	rod <i>Bdellovibrio</i>	<i>Bdellovibrio sp.</i> JSS; EF687743	0.0149
133	4-8 ZEL apr	družina <i>Comamonadaceae</i>	uncultured soil bacterium; UC8; DQ248257	0.0219
134	5-7 ZEL apr	unclassified Bacteria	uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0132
135	5.1-1 ZEL jan	unclassified <i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiales bacterium CRIB 32</i> ; EU363464	0.0358
136	1.2-2 ZEL jan	unclassified <i>Betaproteobacteria</i>	uncultured beta proteobacterium; JG37-AG-125; AJ518783	0.0513
137	2.1-2 ZEL jan	rod <i>Enhydrobacter</i>	<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; 5873; AF005190	0.0055

se nadaljuje

nadaljevanje

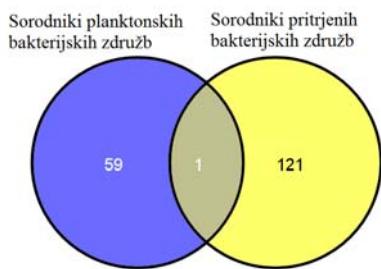
Oznaka fragmenta na TGGE gelu	ime vzorca	Taksonomska uvrstitev	Najbližji sorodnik	p-razlika
138	3.2-3 ZEL jan	rod <i>Gp3</i>	uncultured bacterium; BacA_072; EU335292	0.0326
139	3.2-4 ZEL jan	rod <i>Gp4</i>	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
140	3.2-5 ZEL jan	rod <i>Gp4</i>	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
141	3.2-8 ZEL jan	unclassified <i>Alphaproteobacteria</i>	uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; AMJD5; AM934883	0.0430
142	3.2-9 ZEL jan	unclassified <i>Acetobacteraceae</i>	<i>alpha proteobacterium KC-IT-H9</i> ; FJ711207	0.0439
143	3.3-6 ZEL jan	rod <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas sp. Da-16</i> ; EU073955	0.0000
144	4.2-5 ZEL jan	rod <i>Sterolibacterium</i>	uncultured bacterium; HOClCi25; AY328574	0.0029
145	4.3-3 ZEL jan	unclassified <i>Deltaproteobacteria</i>	uncultured bacterium; G13; AF407700	0.0418
146	5.1-2 ZEL jan	družina <i>Rhodocyclaceae</i>	<i>Denitromonas sp.</i> D1-68; AM403170	0.0630
147	6.1-1 ZEL jan	rod <i>Rhabdochlamydia</i>	uncultured <i>Chlamydia sp.</i> ; PRPR10; DQ903988	0.0100

4.3 PRIMERJAVA SEZNAMA SORODNIKOV SEKVENCIRANIH FRAGMENTOV

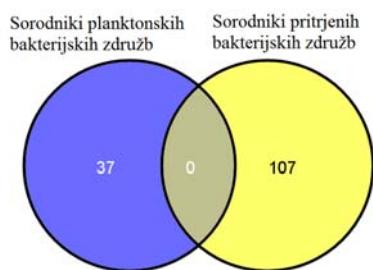
Sezname sorodnikov smo primerjali s spletnim orodjem VENNY (Oliveiros, 2007). Ko smo med sabo po datumih vzorčenja za VS na Dolenjskem primerjali sorodnike sekvenč pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb (5 najbližjih sorodnikov za vsako sekvenco, priloga D) smo ugotovili, da samo za vzorčenje v mesecu januarju obstaja skupni sorodnik- AF364838 (slike 13a, 13b, 13c), kar kaže na veliko raznolikost med pritrjenimi in planktonskimi bakterijskimi združbami.

Ko smo primerjali sorodnike planktonskih bakterijskih združb po letnih časih (slika 14a), smo ugotovili prisotnosti istih sorodnikov za julij in oktober, in sicer treh različnih sekvenč za *Hafnia alvei* in eno za nekultivabilno bakterijo (DQ658768). Več sorodnikov smo ugotovili ob primerjavi pritrjenih bakterijskih združb po letnih časih (slika 14b). Januar in julij sta imela 9 skupnih sorodnikov in sicer si vsi nekultivabilne bakterije. Julij in oktober sta imela skupne sorodnike *Aerococcus viridans*, *Agrococcus sp.*, *Corynebacterium cf. Aquaticum* in *Corynebacteriaceae bacterium* NR121, januar in oktober pa legioneli podobnega patogena amebe ter tri nekultivabilne bakterije.

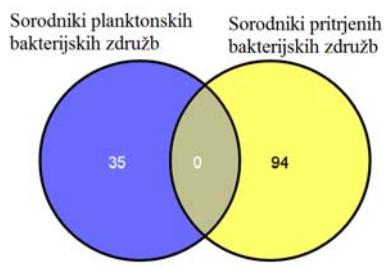
Primerjali smo še združene (pritrjenih in planktonskih bakt. združb) po letnih časih (slika 14c). Januarja in julija so bili prisotni *Leptothrix cholodnii*, *Enterobacter sp.* in nekatere nekultivabilne bakterije, julija in oktobra *Hafnia alvei*, *Aerococcus viridans*, *Agrococcus sp.* in *Corynebacterium cf. Aquaticum* pa tudi januar in oktober sta imela skupnega sorodnika legioneli podobnega patogena amebe. Rezultati nakazujejo, da se struktura bakterijske združbe s časom spreminja.



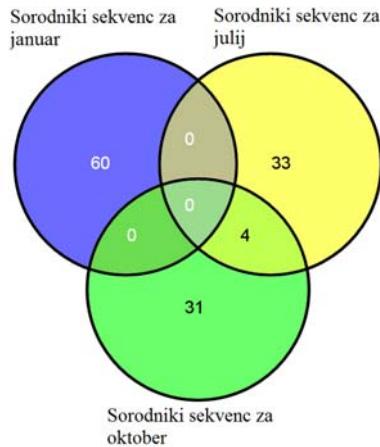
Slika 13a: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v VS na Dolenjskem za januar 2008 (skupen sorodnik: AF364838)



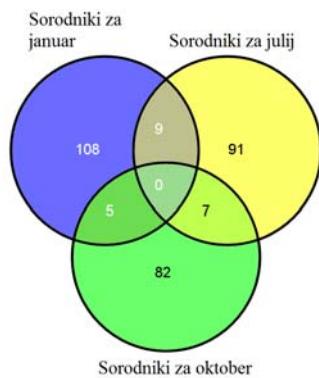
Slika 13b: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v VS na Dolenjskem za julij 2008



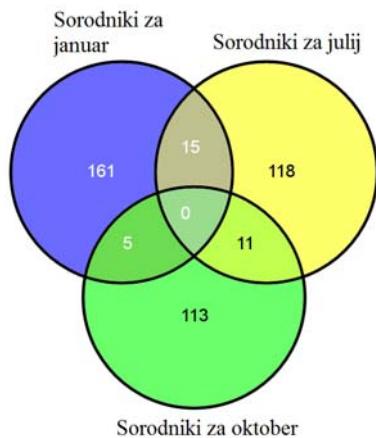
Slika 13c: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih in planktonskih bakterijskih združb v VS na Dolenjskem za oktober 2008



Slika 14a: Vennov diagram sorodnikov planktonskih bakterijskih združb po letnih časih za VS na Dolenjskem



Slika 14b: Vennov diagram sorodnikov pritrjenih bakterijskih združb po letnih časih za VS na Dolenjskem

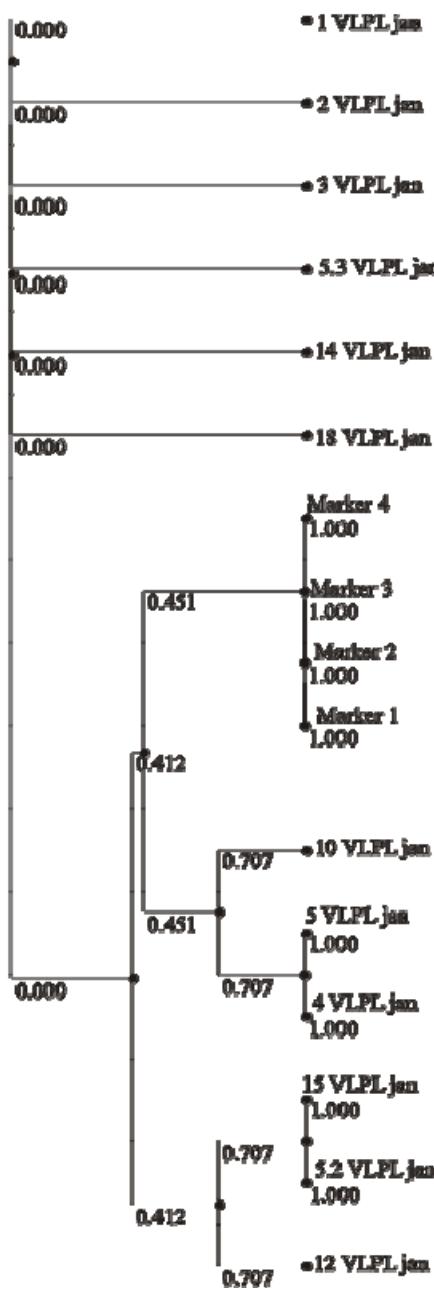


Slika 14c: Vennov diagram zastopanosti skupnih sorodnikov sekvenc (pritrjenih in planktonskih bakt. združb) po letnih časih za VS na Dolenjskem

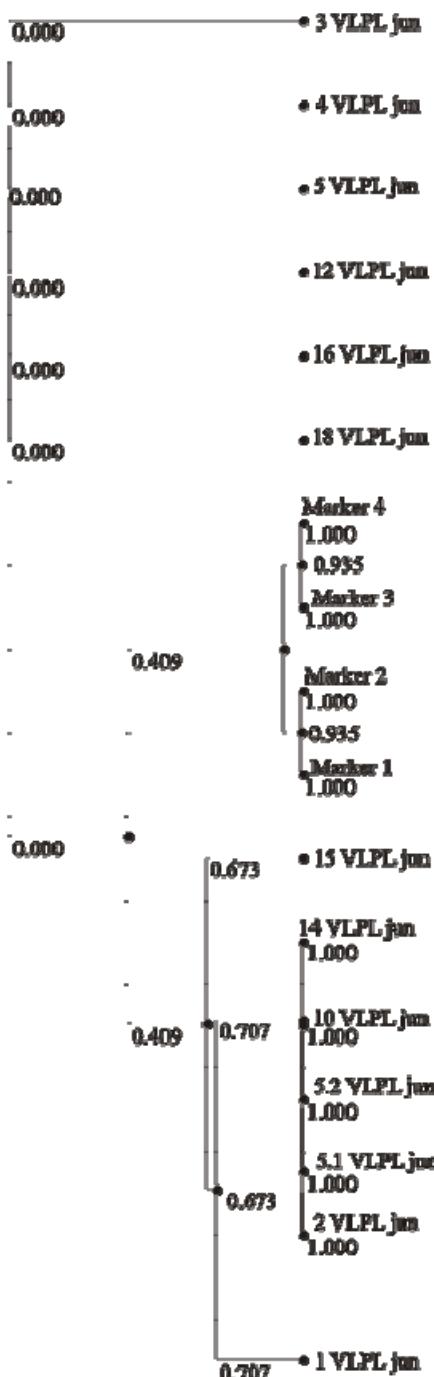
4.4 RAZNOLIKOST BAKTERIJSKIH ZDRUŽB

Planktonske bakterijske združbe glede na TGGE profile kažejo manjšo raznolikost od pritrjenih. Največjo raznolikost planktonskih združb kaže TGGE profil iz januarja (slika 15), kar se tudi ujema z zastopanostjo skupin bakterij glede na sekvencirane fragmente. Visoko podobnost kažeta TGGE profila VM 15 in VM 5.2, ki sta identična (podobnostni koeficient=1), podoben njima je še TGGE profil VM 12 (podobnostni koeficient 0,707) ter TGGE profila VM 5 in VM 4, ki sta prav tako identična, podoben njima pa je VM 10 . Za julijsko in oktobrsko vzorčenje so profili še manj raznoliki. Za oktober (slika 17) opazimo skupino sedmih profilov, ki so identični, ostali pa niso podobni nobenemu. Nekaj profilov iz te skupine (VM 2, VM 5.1, VM 5.2, VM 10) je identičnih tudi za julijsko vzorčenje (slika 16). Tem profilom je julija identičen še profil VM 14.

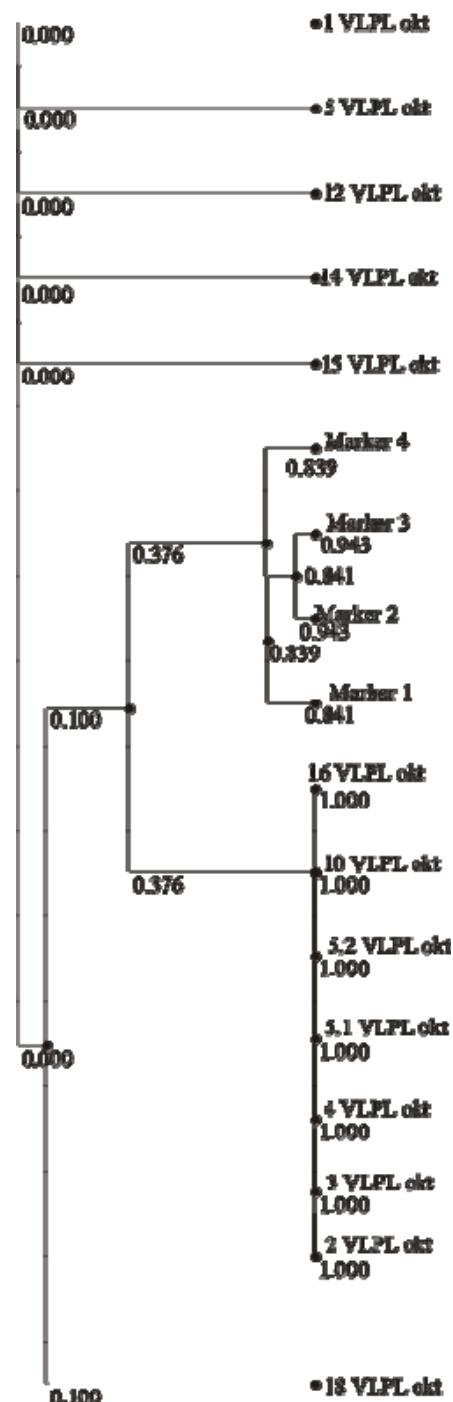
Raznolikost profilov vzorčnih mest za pritrjene bakterijske združbe je največja oktobra (slika 20). Samo profila VM 15 in VM 10 imata visoko podobnost (0,869), podoben njima pa je še VM 4 (0,647). Vsi ostali profili so si manj podobni, čeprav so oblikovani po skupinah, tako kot npr. VM 1, VM 2 in VM 5. Za julij in januar imajo podobno oblikovane skupine večje podobnostne koeficiente. Julija tako opazimo skupino petih identičnih profilov (slika 19), ki so jim podobni še trije profili. Identična sta tudi VM 16 in VM 2. Januarja so bile take skupine profilov še manjše (slika 18), in sicer so eno skupino sestavljali VM 5, VM 3 in VM 4, drugo skupino pa VM 15, VM 10 in VM 12. Zanimivo, je da imata julija in januarja visoko korelacijo VM 5 in VM 4, ki v VS nista v sosledju in ju napajajo različni izviri.



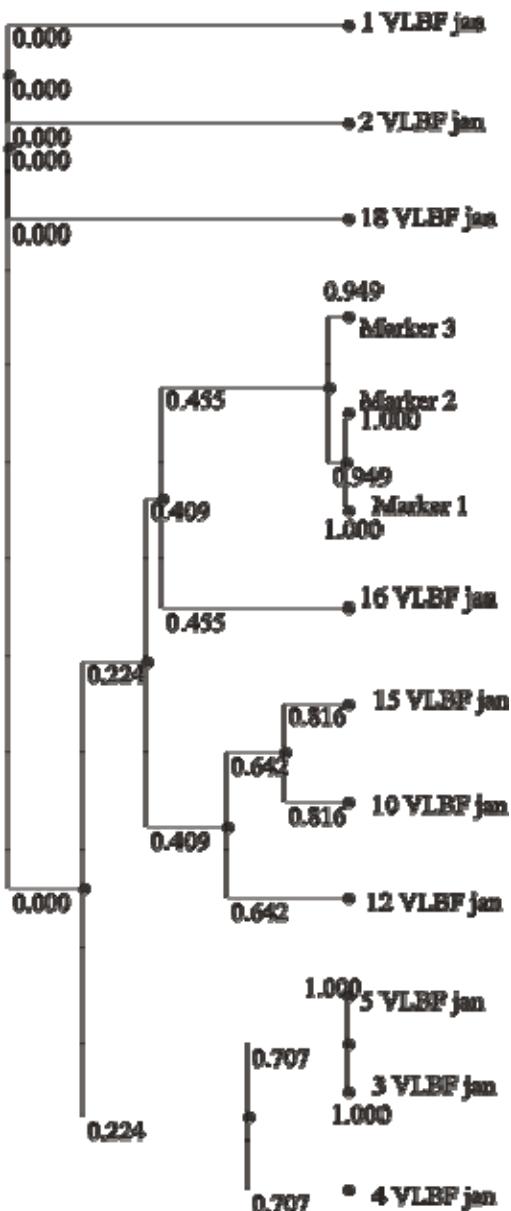
Slika 15: Dendrogram za planktonске bakterijske združbe prisotne januarja v VS na Dolenjskem (vrednosti ob vozliščih predstavljajo podobnostni koeficient med profili vzorčnih mest, številka pred VLPL pa je oznaka vzorčnega mesta)



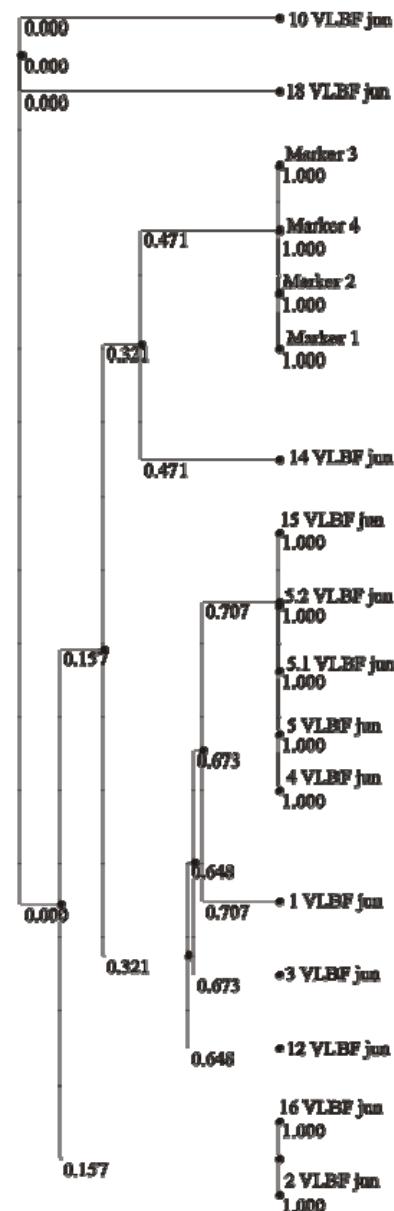
Slika 16: Dendrogram za planktonске bakterijske združbe prisotne julija v VS na Dolenjskem (vrednosti ob vozliščih predstavljajo podobnostni koeficient med profili vzorčnih mest, številka pred VLPL pa je oznaka vzorčnega mesta)



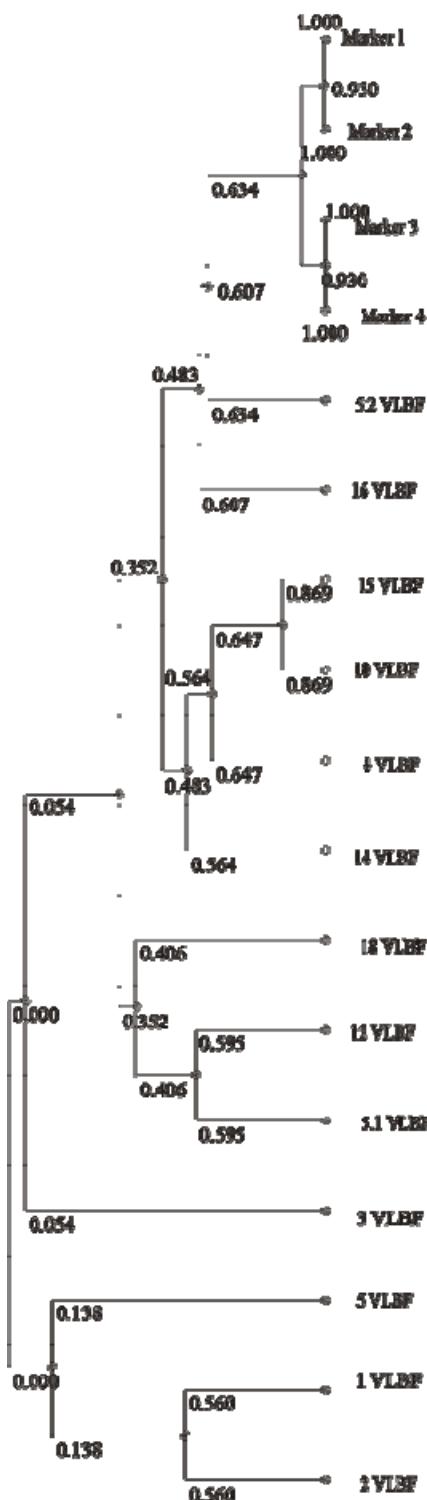
Slika 17: Dendrogram za planktonске bakterijske združbe prisotne oktobra v VS na Dolenjskem (vrednosti ob vozliščih predstavljajo podobnostni koeficient med profili vzorčnih mest, številka pred VLPL pa je oznaka vzorčnega mesta)



Slika 18: Dendrogram za pritrjene bakterijske združbe prisotne januarja v VS na Dolenjskem (vrednosti ob vozliščih predstavljajo podobnostni koeficient med profili vzorčnih mest, številka pred VLBF pa je oznaka vzorčnega mesta)



Slika 19: Dendrogram za pritrjene bakterijske združbe prisotne julija v VS na Dolenjskem (vrednosti ob vozliščih predstavljajo podobnostni koeficient med profili vzorčnih mest, številka pred VLBF pa je oznaka vzorčnega mesta)



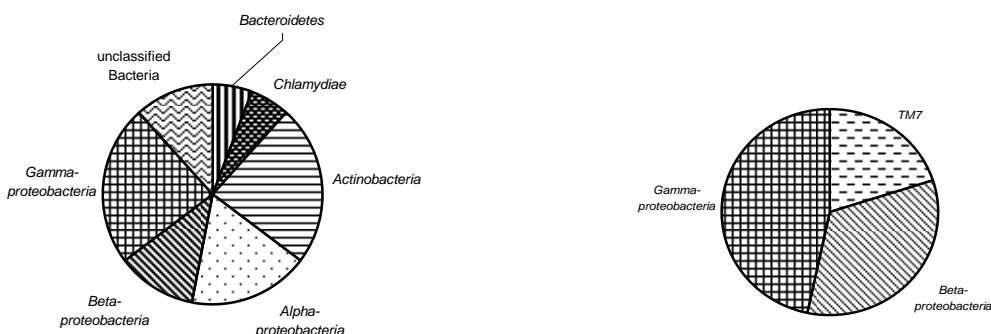
Slika 20: Dendrogram za pritrjene bakterijske združbe prisotne oktobra v VS na Dolenjskem (vrednosti ob vozliščih predstavljajo podobnostni koeficient med profili vzorčnih mest, številka pred VLBF pa je oznaka vzorčnega mesta)

4.5 ZASTOPANOST TAKSONOMSKIH SKUPIN BAKTERIJ V VODOVODNIH SISTEMIH NA DOLENJSKEM IN GORENJSKEM

Edina taksonomska skupina, ki smo jo zasledili pri vseh treh vzorčenjih v VS na Dolenjskem je bil razred *Gammaproteobacteria*, ki je bila prisotna tako v pritrjenih kot planktonskih bakterijskih združbah. Na ostalih vzorčnih mestih v vodovodu smo ugotovili prisotnost bakterij tudi iz drugih taksonomskih skupin. Največja raznolikost planktonskih bakterijskih združb se je pokazala pri januarskem vzorčenju (slika 21a), saj smo sekvene uvrstili v debla *Bacteroidetes*, *Chlamydiae* in *Actinobacteria*, razrede *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria*, dve sekvenci pa sta sorodni predstavniku bakterije, ki še ni uvrščena v taksonomski sistem. Julija smo zasledili samo še predstavnike *Betaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria* in *TM7* (slika 21b), oktobra pa samo še predstavnike *Betaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria* (slika 21c).

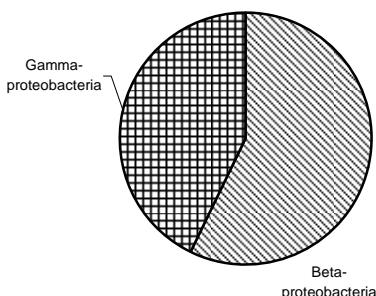
Pritrjene bakterijske združbe so bile sestavljene iz več taksonomskih skupin kot planktonske združbe. Poleg skupin bakterij, ki smo jih določili že pri planktonskih združbah (razen *TM7*), smo ugotovili tudi prisotnost predstavnikov debla *Firmicutes* pri vseh treh vzorčenjih, julija (slika 22b) pa so bili prisotni tudi predstavniki debla *Acidobacteria*, ki jih nikjer drugje nismo zasledili. Julija je bilo največ sekvenc iz razreda *Betaproteobacteria*, medtem, ko januarja tega razreda nismo zasledili (slika 21a). Po kloriranju v mesecu oktobru (slika 22c), se je raznolikost zmanjšala, precej pa se je spremenil tudi delež zastopanosti posameznih skupin. Tako se je predvsem povečala zastopanost razreda *Gammaproteobacteria*, saj je oktobra 50% sekvenc pripadalo tej skupini bakterij.

V VS na Gorenjskem smo zasledili razred *Deltaproteobacteria*, ki ga v VS na Dolenjskem nismo. Pri obeh vzorčenjih smo zasledili še predstavnike razredov *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* in debla *Chlamydiae*, dodatno pa so bili januarja 2009 (slika 23b) prisotni predstavniki debla *Acidobacteria* in *Gammaproteobacteria*, ki jih aprila 2008 (slika 23a) ni bilo. Aprila 2008 je bil prisoten tudi velik delež predstavnikov bakterij, ki še niso uvrščene v taksonomski sistem.

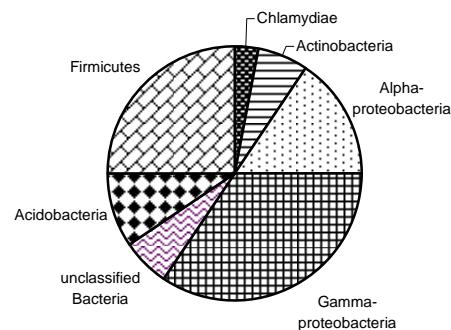


Slika 21a: Zastopanost skupin bakterij v planktonski bakterijski združbi v VS na Dolenjskem januarja 2008

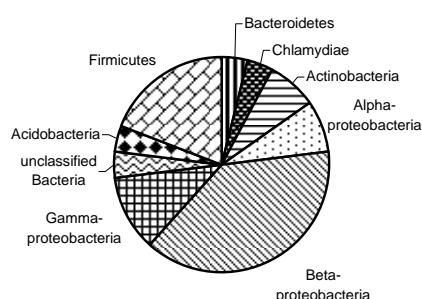
Slika 21b: Zastopanost skupin bakterij v planktonski bakterijski združbi v VS na Dolenjskem julija 2008



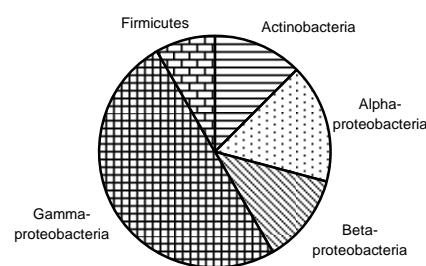
Slika 21c: Zastopanost skupin bakterij v planktonski bakterijski združbi v VS na Dolenjskem oktobra 2008



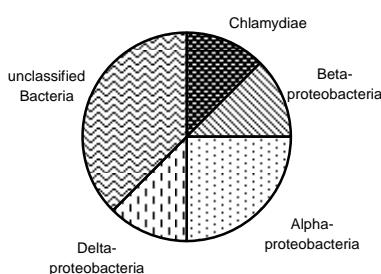
Slika 22a: Zastopanost skupin bakterij v pritrjenih bakterijskih združbah v VS na Dolenjskem januarja 2008



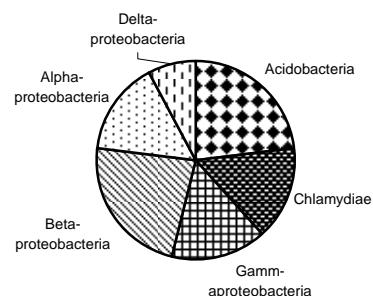
Slika 22b: Zastopanost skupin bakterij v pritrjenih bakterijskih združbah v VS na Dolenjskem julija 2008



Slika 22c: Zastopanost skupin bakterij v pritrjenih bakterijskih združbah v VS na Dolenjskem oktobra 2008



Slika 23a: Zastopanost skupin bakterij v planktonskih bakterijskih združbah v VS na Gorenjskem aprila 2008



Slika 23b: Zastopanost skupin bakterij v planktonskih bakterijskih združbah v VS na Gorenjskem januarja 2009

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Strukturo bakterijske združbe smo določali v VS na Dolenjskem, ki ima probleme z mikrobiološko ustreznostjo pitne vode in v VS na Gorenjskem, ki je utrpel večje poškodbe med naravno nesrečo. Glavna krivca za stanje v dolenjskem VS sta najverjetneje kmetijska dejavnost in odlivi iz greznic v okolici vseh treh izvirov. To potrjujejo tudi rezultati mikrobioloških analiz z gojitvenimi tehnikami (slike 2 do 4), saj so pokazale, da so bile koliformne bakterije prisotne na vseh treh izvirih julija in oktobra, medtem ko so bile januarja detektirane samo na enem izviru (VM 3). Kljub temu, da januarja na dveh izvirih nismo dokazali koliformnih bakterij, pa so te bile prisotne v vodoohramu (VM 5), kjer se zbira voda iz teh dveh izvirov, in v izlivu vode v vodoohram iz cevi po kateri priteče voda iz VM 1 (slika 2). Tak rezultat je lahko posledica občasne prisotnosti bakterij, prisotnosti bakterij pod nivojem detekcije ali pa poškodbe cevi, zaradi katere bi bakterije imele možnost vstopa v sistem.

Poleg koliformnih bakterij smo julija in oktobra preverili še prisotnost enterokokov, ki so zanesljivi indikatorji fekalnega onesnaženja in lahko dlje časa preživijo v vodi. Njihovo prisotnost smo julija ugotovili na vseh vzorčnih mestih, razen na VM 4 (slika 3), oktobra pa so bili prisotni le na VM 14 (slika 4), ki je mrtev rokav. Rezultat kaže, da se je število enterokokov zmanjšalo na zakonodajno določeno raven, medtem ko se je število koliformnih bakterij na posameznih vzorčnih mestih samo rahlo zmanjšalo, vendar je še vedno presegalo mejne vrednosti. Mejna vrednost, določena po zakonodaji (Pravilnik o pitni vodi, 2004), za koliformne bakterije in enterokoke je 0 CFU/100 mL, kar pomeni, da voda že na samih izvirih ne zadostuje zakonodajnim kriterijem.

Število kolonij pri 22°C, ki nakazuje na število bakterij, ki so v VS normalno prisotne, je julija na izvirih in v vodoohramu (VM 5) presegalo mejne vrednosti (pod 100 CFU/mL), toda že na naslednjem vzorčnem mestu se je število kolonij zmanjšalo pod mejno vrednost in je z oddaljenostjo vzorčnih mest od izvirov le še padalo (slika 3). Število bakterij pri 35°C (mejna vrednost pod 100 CFU/mL), se ni bistveno razlikovalo od števila bakterij pri 22°C, razen na VM 15 kjer je bilo 10-krat večje. Po oktobrskem kloriranju je število bakterij na večini vzorčnih mest padlo pod mejno vrednost na vseh vzorčnih mestih, razen na VM 2 in VM 16 pri 37°C (slika 4).

Ker je z gojitvenimi metodami možno določiti samo majhen del bakterij (Defives in sod., 1999), smo v naši raziskavi uporabili molekularno tehniko s katero lahko zajamemo celotno populacijo bakterij, prisotnih na mestu vzorčenja. Strukturo bakterijske združbe smo določili s temperaturno gradientno gelsko elektroforezo (TGGE) v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnoženih delov gena za 16S rRNK. Fragmente, ki so na TGGE gelih najbolj izstopali in so bili vidni s prostim očesom, smo izrezali in sekvencirali. Rezultati sekvenciranja kažejo na časovno in tudi prostorsko raznolikost pojavljanja določenih taksonomskih skupin bakterij.

Raziskav, v katerih so bile uporabljene molekularne tehnike za analizo bakterijskih združb v povezavi z vodovodnimi sistemi, je bilo do sedaj izvedenih malo. V tistih, ki so jih izvedli so ugotovili, da se v planktonskih bakterijskih združbah v vodovodnih sistemih

nahajajo predvsem bakterije iz razredov *Betaproteobacteria* (Kormas in sod., 2009) in *Alphaproteobacteria* ter debla *Bacteroidetes* (Eichler in sod., 2006). V naši raziskavi smo te skupine bakterij prav tako zaznali kot pomembne predstavnike planktonske združbe. Kot zelo pomembne predstavnike smo zaznali še bakterije iz razreda *Gammaproteobacteria*, ki so bile precej zastopane v celotnem VS, bile pa so tudi edine, katerih sekvence, smo pridobili že na samih izvirih (velja za VS na Dolenjskem). Ta rezultat se razlikuje od ugotovitev Pronka in sod. (2009), ki so v kraških izvirih ugotovili prisotnost bakterijskih vrst predvsem iz razredov *Deltaproteobacteria* in debel *Acidobacteria* ter *Nitospira*. Prisotnost vseh naštetih skupin bakterij in tudi ostalih, ki smo jih zasledili, ni presenetljiva, saj se nahajajo tudi v zemlji (Janssen, 2006). Od manj pogostih skupin bakterij, ki se pojavljajo v vodi, smo detektirali predstavnika debel *TM7* in *Chlamydiae*. V deblo *TM7* spadajo zaenkrat samo bakterije, ki jih ni mogoče gojiti, predstavniki pa so znani samo po 16S rDNK sekvencah pridobljenih iz okolja (voda, zemlja, tudi človek), njihova vloga pa ni najbolj razjasnjena (Hugenholtz in sod., 2001). Medtem ko je vloga predstavnikov iz debla *Chlamydiae* mnogo bolj poznana, saj so zelo razširjeni obvezni (obligatni) intracelularni patogeni, ki povzročajo razne infekcije (oci, dihala, spolno prenosljive bolezni) pri človeku, okužijo pa lahko tudi ostale vretenčarje, nevretenčarje in amebe. Kot patogen amebe iz vodovodnega sistema je bil izoliran tudi najbližji sorodnik naše sekvence (Corsaro in sod., 2009). Od ostalih sekvenc je potrebno izpostaviti sekvenco (1-2 VLPL jan), ki smo jo uvrstili v rod *Methylobacter*, njen najbližji sorodnik pa je nekultivabilna bakterija FukuN13, najverjetneje pa je prisotna na vseh vzorčnih mestih in pri vsakem vzorčenju. Vrste iz rodu *Methylobacter* so metanotrofi, ki za vir ogljika in energije izkoriščajo metan, v manjši meri tudi metanol, sposobne pa so tudi oksidacije trikloroetilena in so zanimive za uporabo v bioremediaciji (Smith in sod., 1997).

Podobno zastopanost taksonomskih skupin, kot v VS na Dolenjskem, je bilo opaziti tudi v VS na Gorenjskem. Prisotni so bili predstavniki debel *Proteobacteria*, *Chlamydiae*, *Acidobacteria* in nekaj sorodnikov neklasificiranih bakterij. Glede na majhno število kvalitetnih pridobljenih sekvenc (za nekatera vzorčna mesta samo po ena) lahko predvidevamo, da je raznolikost večja. Iz istega razloga tudi težko opredelimo, kako se je planktonska bakterijska združba spremenila glede na čas. Spremembo lahko ocenimo glede na TGGE profil posamezih vzorčnih mest, kjer je vidno, da se fragmenti DNK za ista vzorčna mesta pri različnih vzorčenjih nahajajo na različnih mestih in da je več fragmentov pri vzorcih iz aprila 2008. Pri vzorcih iz januarja 2009 smo izolirali sekvence dveh bakterij, ki lahko povzročijo različne infekcije pri človeku, in sicer smo iz VM 2 pridobili sekvenco, ki je v bližnjem sorodstvu z *Moraxello osloensis*, iz VM 3 pa sekvenco, ki je v bližnjem sorodstvu s *Stenotrophomonas sp.*

Strukturo pritrjenih bakterijskih združb smo preučevali samo v VS na Dolenjskem. Ugotovili smo, da so poleg predstavnikov taksonomskih skupin, ki smo jih določili v pritrjenih bakterijskih združbah, prisotni tudi predstavniki debel *Acidobacteria* in *Firmicutes*. Tako zastopanost skupin bakterij so opazili tudi v drugih raziskavah pritrjenih združb v VS (Lee in Kim, 2003; Lee in sod., 2005). Skupine bakterij so bile glede na različne čase vzorčja podobno zastopane, razlike so nastajale predvsem na nivoju raznolikosti znotraj debel. Za nekatere predstavnike debel (rodovi *Thermicanus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*), ki smo jih zaznali, smo ugotovili, da so bili prisotni že na izvirih VM1 (tudi *Gammaproteobacteria*) in VM2 januarja ter julija. Ti predstavniki

so se poleg nekaterih dodatnih pojavili tudi na ostalih točkah vodovoda. Do oktobra se je struktura pritrjene bakterijske združbe na izvirih VM1 in VM2 precej spremenila, saj so dominirali predstavniki razredov *Alpha-* in *Gammaproteobacteria*. Spremembo gre pripisati predvsem sezonski dinamiki, v manjši meri pa lahko tudi kloriranju. Iz VM1 smo dobili tri sekvene in vse so bile v sorodu z *Paracoccus yeei*, ki je oportunistični patogen. Tri sekvene za isto bakterijo smo dobili zato, ker v organizmu lahko obstaja več kopij 16S rRNK gena, posledica pa je nastanek več ločenih fragmentov za isti organizem na istem gelu (Nübel in sod., 1996).

Večina izoliranih sekvenčnih sekvenc je bila sorodna s sekvenčnimi bakterijami, ki so naravno prisotne v vodi, zemlji ali na rastlinah (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Agrococcus*, *Aerococcus*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*...), nekaj pa jih je bilo sorodnih z sekvenčnimi bakterijami, ki lahko povzročajo okužbe pri ljudeh in jih ob normalnih razmerah ne najdemo v VS. Tak primer je legioneli podobnen patogen amebe, ki se je nahajal na VM15 in lahko povzroči pljučnico (Marrie in sod., 2001). Na VM12 smo izolirali tudi sekvene sorodne bakterijam *Acinetobacter baumannii* in *Klebsiella pneumoniae*. Ti bakteriji povzročata precej infekcij, problematični pa sta predvsem zaradi njune odpornosti na več vrst antibiotikov (Loivukene in sod., 2006). Julija smo iz vzorčnega mesta 18 izolirali sekvenco, ki je sorodna sekvenčni bakteriji *Brachymonas petroleovorans*, ki raste na cikloheksanih in je bila prvič izolirana iz čistilne naprave rafinerije nafte (Pierre in sod., 2003). Ker raste na cikloheksanih, predvidevamo da je na tem VM prisotna zaradi onesnažil v vodi, kot so npr. nekateri pesticidi ali pa naftni derivati, ki pa jih kemijska analiza ni zajela (preglednica G).

Struktura pritrjene in planktonske bakterijske združbe se razlikuje. Pritrjene združbe prevladujejo, saj imajo določene prednosti. Najpomembnejši prednosti sta predvsem sposobnost uporabiti kot vir energije kompleksne vire ogljika (Camper, 2004) in povečana odpornost na zunanje dejavnike kot so npr. biocidi (LeChevallier in sod., 1988). Za biocide kot sta npr. klor in klorov dioksid so Gagnon in sod. (2005) ugotovili, da sicer zmanjšajo koncentracijo planktonskih celic, na pritrjene celice pa imajo majhen vpliv. Razlogo za večjo odpornost pritrjenih združb lahko iščemo v več različnih dejavnikih, od zmanjšanega prenosa snovi (Stewart in sod., 1996), nastanka odpornih t.i. persister celic in počasne rasti (Spoering in Lewis, 2001) ter nastanka EPS, pomembna pa je tudi starost biofilma in reakcije med površino biofima in biocidom (LeChevallier in sod., 1988). Tudi v naši raziskavi se je glede na rezultate iz julija in oktobra, po oktobrskem kloriranju VS na Dolenjskem, število planktonskih celic zmanjšalo (zmanjšalo se je število koliformnih bakterij, enterokoke pa smo detektirali samo na enem VM, julija pa so bili na vseh, število bakterij pri 22°C in 37°C se je zmanjšalo pod zakonodajno mejno vrednost), vendar ne moremo točno določiti ali je razlog temu kloriranje ali sezonska dinamika, saj pred kloriranjem nismo vzorčili.

Večina raziskav vodovodnih sistemov je bila opravljena z gojitvenimi tehnikami, raziskav opravljenih z molekularnimi metodami pa je malo. Da bi bilo potrebno storiti več, kažejo rezultati naše raziskave, saj smo z uporabo metode TGGE odkrili kar nekaj bakterij, ki so sposobne povzročiti infekcije pri ljudeh. Teh bakterij ni možno odkriti z gojitvenimi tehnikami, ki so predpisane z zakonodajo, zato bi bilo v prihodnosti potrebno vzporedno uporabljati tudi molekularne metode, ki bi to omogočile.

Na podlagi rezultatov raziskave lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Struktura bakterijske združbe se na izviru razlikuje od bakterijske združbe v vodovodu, kjer so prisotni tudi predstavniki dodatnih taksonomskeh skupin bakterij
- Na nekaterih vzorčnih mestih so prisotne iste taksonomske skupine bakterij
- Struktura planktonske bakterijske združbe se razlikuje od strukture pritrjene bakterijske združbe
- Struktura planktonskih in pritrjenih bakterijskih združb se s časom spreminja

6 POVZETEK

Kakovostna pitna voda je izjemno pomembna za življenje človeka, vendar kljub dvigu okoljske ozaveščenosti v zadnjih letih, se za varno pitno vodo marsikje ne poskrbi dovolj. Na splošno problem predstavlja onesnaževanje, še posebej zaradi kmetijske dejavnosti in odlivov iz gresnic v okolini vodnih virov. Posledice tega so vidne predvsem na neustreznem mikrobiološkem stanju vode. Za tako stanje niso krivi vedno zunanji dejavniki, vzrok lahko predstavljajo kompleksna dogajanja v samem vodovodnem sistemu (poškodbe cevi in spojev, padec tlaka).

Mikroorganizmi, ki na kakršenkoli način vstopijo v VS, so sposobni narediti veliko škode. Vplivajo lahko na senzorične lastnosti vode (voda zaradi njih postane motna, neprijetnega okusa in vonja), rastejo na površinah cevi ali pa so potencialni patogeni za človeka. Zato je potrebno spremljati mikrobiološko stanje vode in preverjati prisotnost indikatorjev, ki kažejo na možen obstoj patogenov v vodovodnem sistemu. Zakonodaja za spremljanje mikrobiološkega stanja vode določa gojitvene tehnike, ki zajamejo majhen del populacije, saj je trenutno možno gojiti samo približno 1% mikroorganizmov. Za boljši vpogled v mikrobiološko stanje sistema je potrebno uporabiti molekularne tehnike, ki omogočajo analizo tudi nekultivabilnih bakterij.

V naši raziskavi smo za analizirali strukture bakterijskih združb v vodovodnem sistemu na Dolenjskem, ki ima probleme z mikrobiološko ustreznostjo pitne vode, in v vodovodnem sistemu na Gorenjskem, ki ga je prizadela naravna nesreča. Uporabili smo molekularno tehniko temperaturno gradientno gelsko elektroforezo (TGGE). S to tehniko smo ločili s PCR pomnožene odseke gena za 16S rRNK, ki so bili enake dolžine. Ločevanje temelji na zmanjšani elektroforetski mobilnosti delno raztopljenih dvooverižnih DNK fragmentov v poliakrilamidnem gelu ob linearinem temperaturnem gradientu, fragmenti pa se ustavijo, ko se njihova struktura spremeni zaradi temperature. Fragmente, ki so dominirali, smo iz gelov izrezali in sekvencirali.

Analiza sekvenc je pokazala, da se v vodovodnem sistemu na Dolenjskem planktonske in pritrjene bakterijske združbe po strukturi razlikujejo. Več taksonomskih skupin smo zasledili v pritrjenih bakterijskih združbah, vendar kljub temu razlike nastajajo predvsem v zastopanosti različnih filotipov znotraj taksonomskih skupin, saj povsod zasledimo prevlado istih taksonomskih skupin bakterij. Prevladujejo predvsem predstavniki iz razredov *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* in *Alphaproteobacteria*, v pritrjenih bakterijskih združbah pa tudi predstavniki debla *Firmicutes*. Ugotovili smo tudi prisotnost nekaterih bakterij, ki lahko škodujejo človekovemu zdravju.

Z spremembo letnega časa se je spremenila tudi struktura bakterijskih združb. Analiza TGGE profilov je pokazala, da je raznolikost pritrjenih združb največja oktobra, za ostala vzorčenja pa približno enaka, medtem ko je analiza TGGE profilov planktonskih združb največjo raznolikost pokazala za januar. Na manjšo raznolikost planktonske združbe oktobra je verjetno vplivalo kloriranje, ki pa na pritrjeno združbo ni imelo vpliva.

Analiza TGGE profilov je tudi pokazala, da je struktura združbe na nekaterih mestih vodovoda v določenem časovnem obdobju lahko podobna, vendar podobnost med izviri in ostalimi mesti pa je ponavadi majhna.

V VS na Gorenjskem, kjer smo analizirali samo planktonske bakterijske združbe, smo ugotovili podobno zastopanost taksonomskih skupin, kot v VS na Dolenjskem. Prevladovali so predvsem predstavniki debel *Proteobacteria*, *Chlamydiae* in *Acidobacteria*, raznolikost družbe pa je bila večja aprila 2008.

Poleg določanja strukture, smo z gojitvenimi tehnikami preverili prisotnost indikatorskih organizmov v vodi. V VS na Dolenjskem smo v vseh letnih časih zasledili prisotnost koliformnih bakterij, največ jih je bilo julija, nekaj manj pa smo jih detektirali tudi oktobra, kljub temu, da je bilo 1 teden pred vzorčenjem izvedeno. Mejne vrednosti je julija preseglo tudi število bakterij pri 22°C in 37°C, medtem ko je oktobra število bakterij na večini vzorčnih mest padlo pod mejno vrednost. V VS na Gorenjskem smo samo pri vzorčenju januarja 2009 na nekaterih vzorčnih mestih ugotovili prisotnost bakterij fekalnega izvora, kar pomeni da tudi tam voda ni povsem ustrezala mikrobiološkim kriterijem.

7 VIRI

- Allen M.J., Edberg S.C., Reasoner D.J. 2004. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water. International Journal of Food Microbiology, 92: 265-274
- Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A., Gilbert P. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. FEMS Microbiology Letters, 167: 179-184
- Ampe F., Ben Omar N., Moizan C., Wacher C., Guyot J.P. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 65, 5464-5473
- Atlas okolja. 2007. ARSO
http://gis.arso.gov.si/atlasokolja/profile.aspx?id=Atlas_Okolja_AXL@Arso (1. jul. 2009)
- Batté M., Appenzeller B.M.R., Grandjean D., Fass S., Gauthier V., Jorand F., Mathieu L., Boualam M., Saby S., Block J.C. 2003. Biofilms in drinking water distribution systems. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 2: 147-168
- Berman D., Rice E.W., Hoff C. 1988. Inactivation of Particle-Associated Coliforms by Chlorine and Monochloramine. Applied and Environmental Microbiology, 54, 2: 507-512
- Boyd A., Chakrabarty A.M. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology, 60, 7: 2355-2359
- Busscher H.J., Weerkamp A.H. 1987. Specific and non-specific interactions: role in bacterial adhesion to solid substrata. FEMS Microbiology Reviews, 46: 165-173
- Camper A. 2004. Involvement of humic substances in regrowth. International Journal of Food Microbiology, 92: 355-364
- Camper A., Burr M., Ellis B., Butterfield P., Abernathy C. 1999. Development and structure of drinking water biofilms and techniques for their study. Journal of Applied Microbiology, 85: 1S-12S
- Codony F., Morató J., Mas J. 2005. Role of discontinuous chlorination on microbial production by drinking water biofilms. Water Research, 39: 1896-1906
- Committee on Public Water Supply Distribution Systems: Assessing and Reducing Risks in National Research Council 2006. Drinking Water Distribution Systems: Assessing and Reducing Risks. Washington, DC, National Academies Press: 391 str.

- Corsaro D., Feroldi V., Saucedo G., Ribas F., Loret J-F., Greub G. 2009. Novel *Chlamydiales* strains isolated from a water treatment plant. *Environmental Microbiology*, 11, 1: 188-200
- Costerton J.W. 1995. Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 137-140
- Dahllöf I. 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 213-217
- Defives C., Guyard S., Oularé M.M., Mary P., Hornez J.P. 1999. Total counts, culturable and viable, and non-culturable microflora of a French mineral water: a case study. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 1033-1038
- Eichler S., Christen R., Höltje C., Westphal P., Bötel J., Brettar I., Mehling A., Höfle M.G. 2006. Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3: 1858-1872
- Ford T.E. 1999. Microbiological Safety of Drinking Water: United States and Global Perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 107: 191-206
- Gagnon G.A., Rand J.L., O'Leary K.C., Rygel A.C., Chauret C., Andrews R.C. 2005. Disinfectant efficacy of chlorite and chlorine dioxide in drinkingwater biofilms. *Water Research*, 39: 1809-1817
- Geldreich E.E. 1996. Microbial quality of water supply distribution system. Boca Raton, CRC Press: 504 str.
- Gopal K., Tripathy S.S., Bersillon J.L., Dubey S.P. 2007. Chlorination byproducts, their toxicodynamics and removal from drinking water. *Journal of Hazardous Materials*, 140: 1-6
- Guidelines for drinking-water quality: incorporating first addendum. 2006. Vol. 1, Recommendations. 3rd ed. Geneva, WHO: 515 str.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98
- Hallam N.B., West J.R., Forster C.F. 2001. The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Research*, 35, 15: 4063-4071
- Hall-Stoodley L., Stoodley P. 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 228-233
- Hočevar-Grom A., Hojs A., Vračko P. 2005. Hidrični izbruhi v Sloveniji. V: *Vodni dnevi 2005*, Portorož, 12-13 okt. 2005. Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 86-90

Hugenholz P., Tyson G.W., Webb R.I., Wagner A.M., Blackall L.L. 2001. Investigation of Candidate Division TM7, a Recently Recognized Major Lineage of the Domain *Bacteria* with No Known Pure-Culture Representatives. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 1: 411-419

IVZ RS. 2008. Mikrobiološka preskušanja vzorcev pitne vode - metode in rezultati: 5 str.
<http://www.ivz.si/index.php?akcija=novica&n=1467> (1. jul. 2009)

Janssen P.H. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3: 1719-1728

Justé A., Thomma B.P.H.J., Lievens B. 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25: 745-761

Klun N. 2003. Mikrobiologija pitne vode. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 589-604

Kormas K.A., Neofitou C., Pachiadaki M., Koufostathi E. 2009. Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system. *Environmental Monitoring and Assessment*.

<http://www.springerlink.com/content/708123750vgv3164/fulltext.pdf> (30. jun. 2009)

LeChevallier M.W., Cawthon C.D., Lee R.G. 1988. Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 3: 649-654

LeChevallier M.W., Schulz W., Lee R.G. 1991. Bacterial Nutrients in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 3: 857-862

Lee D.G., Kim S.J. 2003. Bacterial species in biofilm cultivated from the end of the Seoul water distribution system. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 317-324

Lee D.G., Lee J.H., Kim S.J. 2005. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21: 155-162

Likar M. 2000. Mikrobiologija okolja. Ljubljana, Založba ZSTI Slovenije: 249 str.

Lõivukene K., Sepp E., Adamson V., Mitt P., Kallandi Ü., Otter K., Naaber P. 2006. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in Estonian intensive care units in comparison with European data. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 38, 11-12: 1001-1008

Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R. 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International*, 34: 265-276

Marrie T.J., Raoult D., La Scola B., Birtles R.J., de Carolis E. 2001. Legionella-like and other amoebal pathogens as agents of community-acquired pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 6: 1026-1029

Monitoring pitne vode 2007. Poročilo o pitni vodi v republiki Sloveniji. 2008. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 65 str.

Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 317-322

Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127-141

Nadell C.D., Xavier J.B., Levin S.A., Foster K.R. 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*, 6,1: 171-179

Niquette P., Servais P., Savoir R. 2000. Impacts of pipe materials on densities of fixed bacterial biomass in a drinking water distribution system. *Water Research*, 34: 1952-1956

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

O'Connor D.R. 2002. Part two Report of the Walkerton Inquiry: A strategy for safe drinking water. Toronto. Ontario Ministry of the Attorney General: 588 str.

Oliveros J.C. 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. Bioinformatics for genomics and proteomics.
<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (20. jul. 2009)

O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54: 49-79

Percival S.L., Walker J.T., Hunter P.R. 2000. Microbiological Aspects of biofilms and drinking water. Boca Raton, CRC Press: 229 str.

Pierre E.R., Mario W.C. 2003. Isolation of *Brachymonas petroleovorans* CHX, a novel cyclohexane-degrading L-proteobacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 227: 101-106

Podlipnik B. 2007. Zakonodaja oskrbe s pitno vodo. V: Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost: Voda. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 207-219

Pravilnik o pitni vodi. Ur.l. RS št. 19-865/04

Pronk M., Goldscheider N., Zopfi J. 2009. Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. *Hydrogeology Journal*, 17, 1: 37-48

Safe piped water: managing microbial water quality in piped distribution systems. 2004. Ainsworth R. (ed.). WHO: 147 str.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/en/safepipedwater.pdf (30. jun. 2009)

Sekiguchi H., Tomioka N., Nakahara T., Uchiyama H. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*, 23: 1205-1208

Sheffield V.C., Cox D.R., Myers R.M. 1989. Attachment of a 40-bp G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of singlebase changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 86: 232-236

Shimizu T., Ohshima S., Ohtani K., Hoshino K., Honjo K., Hayashi H. 2001. Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. *Systematic and Applied Microbiology*, 24: 149-156

Smith K.S., Costello A.M., Lidstrom M.E. 1997. Methane and Trichloroethylene Oxidation by an Estuarine Methanotroph, *Methylobacter* sp. Strain BB5.1. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 11: 4617-4620

Spoering A.L., Lewis K. 2001. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183, 23: 6746-6751

Stewart P.S., Franklin M.J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 3: 199-210

Stewart P.S., Hamilton M.A., Goldstein B.R., Schneider B.T. 1996. Modeling biocide action against biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 49: 445-455

Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56: 187-209

Sutherland I.W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*, 9,5: 222-227

Szewzyk U., Szewzyk R., Manz W., Schleifer K.H. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annual Review of Microbiology*, 54: 81-127

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599

The Microbiology of Drinking Water. 2002. Part 1, Water Quality and Public Health. Methods for the Examination of Waters and Associated Materials. Drinking water inspectorate: 47 str.
<http://www.dwi.gov.uk/regs/pdf/part1.pdf> (1. jul. 2009)

Ultee A., Souvatzsi N., Maniadi K., König K. 2004. Identification of the culturable and nonculturable bacterial population in ground water of a municipal water supply in Germany. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 560-568

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Kersters K., Swings J. 1996. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological Reviews*, 60, 2: 407-438

Van der Kooij D., Veenendaal H. R., Baars-Lorist C., van der Klift H. W., Drost, Y. C. 1995. Biofilm formation on surfaces exposed to treated water. *Water Research*, 29: 1655-1662

Van der Kooij D. 1999. Potential for biofilm development in drinking water distribution systems. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 39S-44S

Van der Kooij D. 2000. Biological stability: A multidimensional quality aspect of treated water. *Water, Air, and Soil Pollution*, 123: 25-34

Verstraeten N., Braeken K., Debekumari B., Fauvert M., Fransaer J., Vermant J., Michielis J. 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16, 10: 496-506

Wimpenny J., Manz W., Szewzyk U. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 661-671

Zacheus O.M., Iivanainen E.I., Nissinen T.K., Lethola M.J., Martikainen P.J. 2000. Bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride, polyethylene and stainless steel exposed to ozonated water. *Water Research*, 34: 63-70

ZAHVALA

Velika zahvala Inštitutu za fizikalno biologijo, ki mi je omogočil izdelavo te naloge.

Velika zahvala somentorju dr. Alešu Lapanje za vodenje pri pisanju diplome, trud in razumevanje.

Hvala mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za svobodo pri izbiri diplomske naloge, za pomoč in nasvete pri pisanju.

Velika zahvala Jaki, ki me je vodil skozi večino dela v laboratoriju in mi pomagal s tisoč in enim nasvetom. Hvala Manci za mirne živce ob pogledu na prazne agarozne gele s PCR produkti. Hvala vsem ostalim sodelavcem inštituta, ki ste mi vedno priskočili na pomoč, če sem karkoli potreboval.

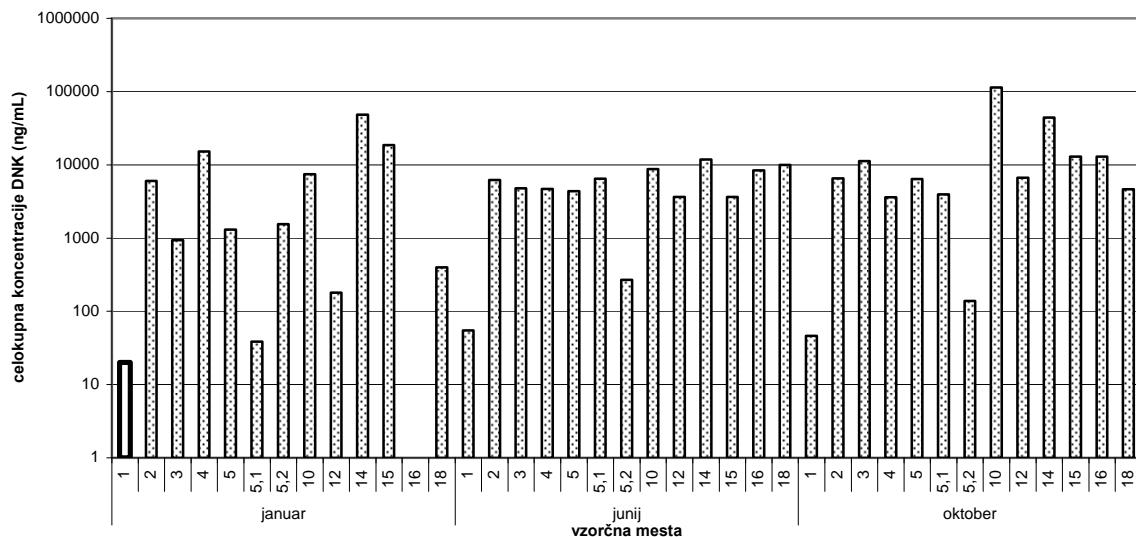
Zahvala tudi recenzentu prof. dr. Davidu Stoparju za strokovni pregled naloge.

Velika zahvala tudi družini in Sanji za podporo.

PRILOGE

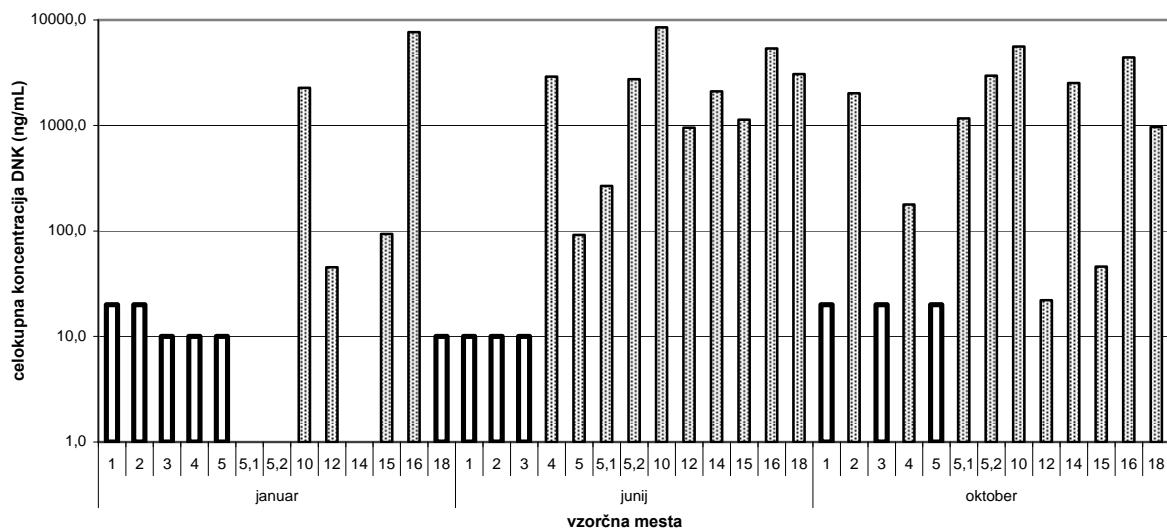
Priloga A: Koncentracija celokupne DNK izolirane iz planktonskih bakterijskih združb iz VS na Dolenjskem

Na vzorčnem mestu 16 januarja niso bile vzorčene planktonske bakterijske združbe, koncentracija celokupne DNK iz vzorčnega mesta 1 pa je bila pod mejo detekcije (pod 20 ng/mL)

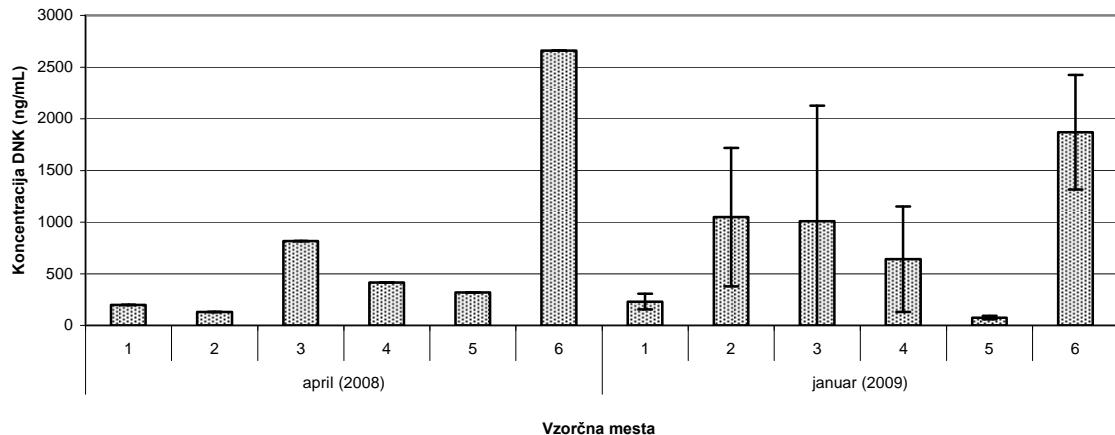


Priloga B: Koncentracija celokupne DNK izolirane iz pritrjenih bakterijskih združb iz VS na Dolenjskem

Na vzorčnih mestih 5.1 in 5.2 januarja niso bile vzorčene pritrjene bakterijske združbe, neobarvani stolpci predstavljajo koncentracijo celokupne DNK, ki je bila pod mejo detekcije



Priloga C:
Koncentracija celokupne DNK izolirane iz planktonskih bakterijskih združb iz VS na Gorenjskem



Priloga D:
Seznam vseh sekvenciranih fragmentov in njihovih najbližjih sorodnikov z izračunanimi p-razdaljami

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
1	1-2_VLPL_jan	uncultured bacterium FukuN13; AJ290055	0.0208
		<i>Crenothrix polyspora</i> ; 13; DQ295887	0.0278
		<i>Crenothrix polyspora</i> ; 14; DQ295888	0.0278
		<i>Crenothrix polyspora</i> ; 23; DQ295890	0.0278
		endosymbiont of <i>Sclerotilum contortum</i> ; Scon; AM883183	0.0278
2	1-4_VLPL_jan	uncultured bacterium FukuN13; AJ290055	0.0135
		uncultured bacterium; LS4-144; AB234276	0.0202
		<i>Methylomicrobium album</i> (T); ACM 3314, IMET 10526, NCIMB 11123; X72777	0.0236
		<i>Methylobacter luteus</i> ; ACM 3304, NCIMB 11914; X72772	0.0168
		uncultured bacterium; IHE0_1191; AB476240	0.0236
3	2-1_VLPL_jan	uncultured bacterium FukuN13; AJ290055	0.0203
		<i>Methylococcaceae</i> bacterium ET-HIRO; AB453957	0.0270
		<i>Crenothrix polyspora</i> ; 13; DQ295887	0.0270
		<i>Crenothrix polyspora</i> ; 14; DQ295888	0.0270
		<i>Crenothrix polyspora</i> ; 23; DQ295890	0.0270
4	5.1-2_VLPL_jan	uncultured bacterium; SDKAS1_13; AY734241	0.0419
		uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0719
		uncultured bacterium; Biofilm_256d_c16; DQ058677	0.0749
		uncultured bacterium; Biofilm_94d_c2; DQ058678	0.0719
		uncultured bacterium; P9X2b3C09; EU491114	0.0689

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
5	5.1-3_VLPL_jan	uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0471
		uncultured bacterium; SDKAS1_13; AY734241	0.0914
		uncultured bacterium; Biofilm_256d_c16; DQ058677	0.0859
		uncultured bacterium; Biofilm_94d_c2; DQ058678	0.0831
		uncultured bacterium; P9X2b3C09; EU491114	0.0803
6	5.2-4_VLPL_jan	<i>Flavobacterium</i> sp. HTCC554; AY584585	0.0107
		endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. HLA; AF366582	0.0107
		<i>Flavobacterium</i> sp. WB 3.1-83; AM177615	0.0107
		<i>Flavobacterium</i> sp. P-131; AM412168	0.0107
		<i>Flavobacterium</i> sp. BF101; AM934680	0.0107
7	10-2_VLPL_jan	<i>Ideonella</i> sp. B508-1; AB049105	0.0033
		<i>Ideonella</i> sp. B511; AB049106	0.0033
		<i>Ideonella</i> sp. B513; AB049107	0.0033
		<i>Leptothrix mobilis</i> (T); Feox-1; X97071	0.0033
		<i>Leptothrix cholodnii</i> ; CCM 1827; X97070	0.0033
8	14-11_VLPL_jan	uncultured <i>Aquabacterium</i> sp.; YJQ-2; AY569280	0.0274
		uncultured bacterium; 233ds5; AY212680	0.0308
		<i>Leptothrix</i> sp. S1.1; DQ241397	0.0274
		uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; ADK-GRe02-95; EF520457	0.0274
		uncultured bacterium; p5h12ok; FJ478604	0.0274
9	14-2_VLPL_jan	uncultured actinobacterium; NO3; AJ575556	0.0029
		uncultured actinobacterium; N5; AJ575532	0.0029
		uncultured bacterium; S9F-52; AB154310	0.0029
		uncultured actinobacterium; D2; AJ867923	0.0029
		uncultured actinobacterium; ST11-10; DQ316356	0.0029
10	14-3_VLPL_jan	uncultured actinobacterium; BR1B6; EU117563	0.0435
		uncultured bacterium; S9F-52; AB154310	0.0435
		uncultured actinobacterium; FNE11-3; DQ316345	0.0401
		uncultured <i>Microbacteriaceae</i> bacterium; SOC1 6H; DQ628961	0.0435
		uncultured actinobacterium; FF1E6; EU117672	0.0435
11	14-7_VLPL_jan	endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. UWC22; AF083616	0.0781
		endosymbiont of <i>Acanthamoeba</i> sp. TUME1; AF098330	0.0781
		<i>Neochlamydia</i> sp. CRIB37; EU683885	0.0811
		uncultured bacterium; FFCH17845; EU133918	0.0909
		<i>Chlamydiales</i> bacterium CRIB 32; EU363464	0.0687
12	14-8_VLPL_jan	uncultured actinobacterium; NO3; AJ575556	0.0068
		uncultured actinobacterium; N5; AJ575532	0.0068
		uncultured bacterium; S9F-52; AB154310	0.0068
		uncultured actinobacterium; D2; AJ867923	0.0068
		uncultured actinobacterium; ST11-10; DQ316356	0.0068

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
13	14-9_VLPL_jan	uncultured actinobacterium; ST11-10; DQ316356	0.0085
		uncultured actinobacterium; ADK-MOh02-96; EF520359	0.0085
		uncultured actinobacterium; SL36; AY466488	0.0085
		uncultured actinobacterium; GR1D3; EU117700	0.0085
		uncultured actinobacterium; LT1B7; EU117819	0.0085
14	15-4_VLPL_jan	uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; HAVOmat41; EF032738	0.0563
		uncultured bacterium; F16; FJ230899	0.1102
		<i>Prosthecomicrobium mishustinii</i> ; 17; FJ560749	0.1017
		uncultured bacterium; JG30-KF-AS50; AJ536878	0.0638
		uncultured bacterium; 1.4.8; EU528259	0.0448
15	15-5_VLPL_jan	AF364838	0.0796
		uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; HAVOmat41; EF032738	0.1327
		uncultured bacterium; L8B4; EF644806	0.0885
		uncultured bacterium; JG30-KF-AS50; AJ536878	0.1239
		uncultured bacterium; 1.4.8; EU528259	0.1150
16	15-8_VLPL_jan	<i>Oceanospirillum sp.</i> ME101; AJ302699	0.0442
		uncultured bacterium; ZA3706c; AF382127	0.0442
		<i>Oceanobacter kriegii</i> (T); IFO 15467; AB006767	0.0442
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; 56S_1B_77; DQ837277	0.0442
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; 56S_1B_50; DQ837272	0.0442
17	15-9_VLPL_jan	uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; HAVOmat41; EF032738	0.0508
		uncultured bacterium; F16; FJ230899	0.1076
		<i>Prosthecomicrobium mishustinii</i> ; 17; FJ560749	0.0992
		uncultured bacterium; JG30-KF-AS50; AJ536878	0.0614
		uncultured bacterium; 1.4.8; EU528259	0.0394
18	1-2_VLPL_jun	uncultured bacterium; JYC-2O; DQ658768	0.0043
		<i>Hafnia alvei</i> ; k 43; AY253922	0.0043
		<i>Hafnia alvei</i> ; IC3211; AB244474	0.0043
		<i>Hafnia alvei</i> ; IC4211; AB244475	0.0043
		<i>Hafnia alvei sensu stricto</i> genomosp. 1; FM179942	0.0000
19	1-3_VLPL_jun	uncultured bacterium; nbt176a05; EU534472	0.0060
		uncultured bacterium; nbt114c07; EU540389	0.0060
		uncultured bacterium; nbt107f04; EU539906	0.0060
		uncultured bacterium; nbt124f08; FJ894002	0.0120
		uncultured bacterium; nbt129h04; FJ894399	0.0120
20	1-4_VLPL_jun	<i>Enterobacter sp.</i> g1; DQ923474	0.0058
		uncultured bacterium; AFEL3_aao15d11; EU465992	0.0058
		uncultured bacterium; RP_3aaa02b01; EU471256	0.0087
		uncultured bacterium; cc116; DQ057366	0.0058
		<i>Enterobacter sp.</i> 3242; DQ923475	0.0058

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
21	4-4_VLPL_jun	<i>Methylobacter tundripaludum</i> (T); type strain: SV96; AJ414655	0.0179
		uncultured bacterium; LO13.6; AF358020	0.0107
		uncultured bacterium; 1H_45; AY546502	0.0179
		uncultured bacterium; 1H_73; AY546504	0.0179
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; 49S1_1B_19; DQ837226	0.0179
22	4-5_VLPL_jun	<i>Methylobacter tundripaludum</i> (T); type strain: SV96; AJ414655	0.0190
		uncultured bacterium; LO13.6; AF358020	0.0127
		uncultured bacterium; 1H_45; AY546502	0.0190
		uncultured bacterium; 1H_73; AY546504	0.0190
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; 49S1_1B_19; DQ837226	0.0190
23	4-6_VLPL_jun	<i>Methylobacter tundripaludum</i> (T); type strain: SV96; AJ414655	0.0554
		uncultured bacterium; LO13.6; AF358020	0.0492
		uncultured bacterium; 1H_45; AY546502	0.0554
		uncultured bacterium; 1H_73; AY546504	0.0554
		uncultured bacterium; 4.2.24; EU528216	0.0554
24	5.2-1_VLPL_jun	<i>Serratia</i> sp. KCK; EF121315	0.0667
		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20; CP000569	0.1007
		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> L20; CP000569	0.1007
		<i>Pasteurella</i> sp. MCCM 02120; AF224304	0.0667
		<i>Pasteurella</i> sp. V4; AB279578	0.1074
25	14-2_VLPL_jun	uncultured bacterium; Elev_16S_1230; EF019868	0.0174
		uncultured bacterium; Elev_16S_1238; EF019876	0.0174
		uncultured bacterium; Elev_16S_1277; EF019907	0.0175
		uncultured candidate division TM7 bacterium; A06-01D; FJ542866	0.0420
		uncultured bacterium; LC41; FJ716004	0.0383
26	14-3_VLPL_jun	uncultured bacterium; Elev_16S_1230; EF019868	0.0174
		uncultured bacterium; Elev_16S_1238; EF019876	0.0174
		uncultured bacterium; Elev_16S_1277; EF019907	0.0175
		uncultured candidate division TM7 bacterium; A06-01D; FJ542866	0.0420
		uncultured bacterium; LC41; FJ716004	0.0383
27	14-4_VLPL_jun	uncultured bacterium; Elev_16S_1230; EF019868	0.0174
		uncultured bacterium; Elev_16S_1238; EF019876	0.0174
		uncultured bacterium; Elev_16S_1277; EF019907	0.0175
		uncultured candidate division TM7 bacterium; A06-01D; FJ542866	0.0420
		uncultured bacterium; LC41; FJ716004	0.0383

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
28	18-1_VLPL_jun	<i>Azohydromonas lata</i> ; IAM 12665; AB201626	0.0065
		uncultured bacterium; TSBAR003_B12; AB486427	0.0065
		uncultured bacterium; TSBAR003_D21; AB486449	0.0065
		uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0033
		uncultured bacterium; TS9; AB378585	0.0065
29	18-2_VLPL_jun	<i>Azohydromonas lata</i> ; IAM 12665; AB201626	0.0061
		uncultured bacterium; TSBAR003_B12; AB486427	0.0061
		uncultured bacterium; nbt35b06; FJ893771	0.0030
		uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000
		uncultured bacterium; TS9; AB378585	0.0061
30	18-3_VLPL_jun	<i>Azohydromonas lata</i> ; IAM 12665; AB201626	0.0061
		uncultured bacterium; TSBAR003_B12; AB486427	0.0061
		uncultured bacterium; nbt35b06; FJ893771	0.0030
		uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000
		uncultured bacterium; TS9; AB378585	0.0061
31	18-4_VLPL_jun	<i>Azohydromonas lata</i> ; IAM 12665; AB201626	0.0031
		uncultured bacterium; TSBAR003_B12; AB486427	0.0031
		uncultured bacterium; TSBAR003_D21; AB486449	0.0031
		uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000
		uncultured bacterium; TS9; AB378585	0.0031
32	18-5_VLPL_jun	<i>Azohydromonas lata</i> ; IAM 12665; AB201626	0.0062
		uncultured bacterium; nbt223f06; EU536904	0.0062
		uncultured bacterium; nbt35b06; FJ893771	0.0031
		uncultured bacterium; nbt35c01; FJ893774	0.0000
		uncultured bacterium; TS9; AB378585	0.0062
33	1-3_VLPL_okt	uncultured bacterium; JYC-2O; DQ658768	0.0084
		<i>Hafnia alvei</i> ; k 43; AY253922	0.0084
		<i>Hafnia alvei</i> ; IC3211; AB244474	0.0084
		<i>Hafnia alvei</i> ; IC4211; AB244475	0.0084
		<i>Ewingella americana</i> ; CH6; EU708318	0.0084
34	1-4_VLPL_okt	<i>Cedecea neteri</i> ; GTC1717; AB086230	0.0100
		uncultured bacterium; XW117; AY941836	0.0100
		<i>Enterobacter sp.</i> YC-8; EU240960	0.0100
		<i>Enterobacter sp.</i> ZJUPD2; EU430754	0.0100
		<i>Averyella dalhousiensis</i> ; VTan-2; DQ481464	0.0100
35	5.2-2_VLPL_okt	<i>Pseudomonas sp.</i> E2.2; AY625608	0.0168
		<i>Pseudomonas sp.</i> ZS29-8; EF471899	0.0168
		uncultured bacterium; EPR4055-N3-Bc77; EU491936	0.0168
		uncultured bacterium; nbt106a10; EU539840	0.0134
		<i>Pseudomonas sp.</i> enrichment culture clone C8; FJ791168	0.0168

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
36	10-4_VLPL_okt	uncultured bacterium; 110; FJ535049	0.0331
		uncultured bacterium; Foos7B_120; EU431755	0.0331
		uncultured bacterium; A14; FJ660543	0.0331
		uncultured bacterium; B13; FJ660504	0.0331
		uncultured bacterium; A74; FJ660571	0.0331
37	14-2_VLPL_okt	<i>Gallionella ferruginea</i> (T); L07897	0.0440
		uncultured beta proteobacterium; 8-5; AF351236	0.0440
		<i>Gallionella ferruginea</i> subsp. <i>capsiferriformans</i> ; DQ386262	0.0440
		uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; ADK-BTh02-80; EF520449	0.0440
		uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; CF_7; EF562568	0.0440
38	16-1_VLPL_okt	<i>Aquaspirillum arcticum</i> ; IAM 14963; AB074523	0.0000
		<i>beta proteobacterium</i> Wuba68; AF336359	0.0000
		Arctic sea ice bacterium ARK10150; AF468344	0.0000
		Arctic sea ice bacterium ARK10118; AF468343	0.0000
		Arctic sea ice bacterium ARK10157; AF468345	0.0000
39	16-3_VLPL_okt	<i>Oxalobacteraceae</i> bacterium HTCC302; AY429714	0.0092
		<i>Oxalobacteraceae</i> bacterium HTCC315; AY429715	0.0092
		uncultured bacterium; RS 8-Bact61; AJ867676	0.0092
		Arctic sea ice bacterium ARK10284; AF468349	0.0092
		uncultured bacterium; BF0001B010; AM696984	0.0092
40	1-1 VLBF jan	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; GH561; X75943	0.0028
		bacterium Te66A; AY587794	0.0028
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> (T); ATCC 14990; D83363	0.0028
		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ; mother C3; 1C3; AM157417	0.0028
		uncultured bacterium; nbu58a01c1; GQ003838	0.0000
41	2-1 VLBF jan	uncultured feedlot manure bacterium B32; AF317369	0.0220
		uncultured feedlot manure bacterium B5; AF317373	0.0358
		<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0027
		<i>Atopostipes suicloacalis</i> (T); PPC79; AF445248	0.0247
		uncultured bacterium; nbt17e10; FJ893130	0.0412
42	2-2 VLBF jan	uncultured feedlot manure bacterium B32; AF317369	0.0220
		uncultured feedlot manure bacterium B5; AF317373	0.0358
		<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0027
		<i>Atopostipes suicloacalis</i> (T); PPC79; AF445248	0.0247
		uncultured bacterium; nbt17e10; FJ893130	0.0412
43	2-3 VLBF jan	uncultured feedlot manure bacterium B32; AF317369	0.0220
		uncultured feedlot manure bacterium B5; AF317373	0.0358
		<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0027
		<i>Atopostipes suicloacalis</i> (T); PPC79; AF445248	0.0247
		uncultured bacterium; nbt17e10; FJ893130	0.0412

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
44	2-4 VLBF jan	uncultured feedlot manure bacterium B32; AF317369	0.0217
		uncultured feedlot manure bacterium B5; AF317373	0.0354
		<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0054
		<i>Atopostipes suicloacalis</i> (T); PPC79; AF445248	0.0245
		uncultured bacterium; nbt17e10; FJ893130	0.0355
45	2-5 VLBF jan	uncultured feedlot manure bacterium B32; AF317369	0.0185
		uncultured feedlot manure bacterium B5; AF317373	0.0309
		<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0062
		<i>Atopostipes suicloacalis</i> (T); PPC79; AF445248	0.0215
		uncultured bacterium; nbt17e10; FJ893130	0.0310
46	2-7 VLBF jan	uncultured feedlot manure bacterium B32; AF317369	0.0164
		uncultured feedlot manure bacterium B5; AF317373	0.0297
		<i>Firmicutes</i> oral clone BX005; AY005049	0.0033
		<i>Atopostipes suicloacalis</i> (T); PPC79; AF445248	0.0197
		uncultured bacterium; nbt17e10; FJ893130	0.0296
47	3-1 VLBF jan	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (T); type strain: LMG 21877 = ATCC 27094; AJ550856	0.0029
		<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; AHID8007; AY545637	0.0029
		<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; 170804JB8; AY730714	0.0029
		<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; AU1220; AY043376	0.0029
		bacterium rJ3; AB021321	0.0029
48	3-2 VLBF jan	<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; 5873; AF005190	0.0060
		<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; LBS6; EU400648	0.0060
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; 391; EF188436	0.0060
		uncultured bacterium; nbw111a03c1; GQ007896	0.0060
		uncultured bacterium; nbw106e02c1; GQ007555	0.0060
49	3-3 VLBF jan	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (T); DSM 2403; X81665	0.0082
		unidentified bacterium; T17; Z93992	0.0082
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; S15A-MN113; AJ534674	0.0082
		uncultured bacterium; CE2_f07_1; EU468036	0.0082
		uncultured bacterium; nbw118e06c1; GQ008541	0.0082
50	4-1 VLBF jan	uncultured <i>Acidobacteria bacterium</i> ; S15A-MN55; AJ534690	0.0047
		uncultured <i>Geothrix sp.</i> ; S15B-MN21; AJ583203	0.0047
		uncultured <i>Acidobacteria bacterium</i> ; FTLM5; AF529125	0.0047
		uncultured bacterium; pLW-58; DQ066996	0.0095
		uncultured bacterium; BS069; AB240249	0.0047
51	4-3 VLBF jan	uncultured <i>Agrobacterium sp.</i> ; VOTO1-F; EF554922	0.0087
		<i>Agrobacterium sp.</i> FeL02; EU741035	0.0087
		<i>Rhizobium larrymoorei</i> ; SSR03; EU373312	0.0087
		AF364838	0.0087
		AF364839	0.0087

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
52	4-6 VLBF jan	uncultured bacterium; BF0001C091; AM697250	0.1020
		uncultured bacterium; nbu182f07c2; GQ002948	0.1088
		uncultured bacterium; nbw802a04c1; GQ012813	0.1088
		uncultured bacterium; nbw818b04c1; GQ015557	0.1020
		uncultured bacterium; nbu206g08c1; GQ019767	0.1020
53	10-1 VLBF jan	uncultured <i>Pietermaritzburg bacterium</i> Y14-5; AF312219	0.0657
		uncultured earthworm intestine bacterium; wi14; AY154482	0.0657
		uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0657
		uncultured bacterium; HTI; DQ497750	0.0657
		uncultured bacterium; HTK; DQ497758	0.0657
54	10-2 VLBF jan	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
		uncultured bacterium; HTI; DQ497750	0.0000
		uncultured bacterium; HTK; DQ497758	0.0000
		uncultured bacterium; CVCloAm2Ph140; AM777958	0.0000
		uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium; OTU9/APA; 1B5; AM902634	0.0000
55	10-4 VLBF jan	uncultured bacterium; HB1; EF648015	0.0453
		uncultured bacterium; HB39; EF648048	0.0453
		uncultured bacterium; HB77; EF648075	0.0453
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; HB127; EF648107	0.0488
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; XJ105; EF648153	0.0453
56	10-6 VLBF jan	bacterium Ellin6023; AY234675	0.0139
		uncultured bacterium; AKIW573; DQ129586	0.0223
		uncultured bacterium; 91-98; EF157169	0.0223
		<i>Geodermatophilus</i> ; 33S, limestone, Negev desert, Israel; X92362	0.0111
		<i>Geodermatophilus</i> ; B-SWPS, rock varnish, Mojave desert, USA; X92363	0.0139
57	1-2 VLBF jan	<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; Ben 58; X95304	0.0000
		<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; PIV-10-1; AJ505859	0.0000
		<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (T); type strain: LMG 21877 = ATCC 27094; AJ550856	0.0000
		<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; 170804JB8; AY730714	0.0000
		bacterium rJ3; AB021321	0.0000
58	12-1 VLBF jan	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (T); ATCC13883T; Y17656	0.0067
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; 342; AF394537	0.0067
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; Klebs313; Y17668	0.0067
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; AB2844; Y11488	0.0067
		uncultured bacterium; RL187_aan80d08; DQ804474	0.0067
59	12-2 VLBF jan	uncultured <i>Pietermaritzburg bacterium</i> Y14-5; AF312219	0.0000
		uncultured earthworm intestine bacterium; wi14; AY154482	0.0000
		uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
		uncultured bacterium; HTI; DQ497750	0.0000
		uncultured bacterium; HTK; DQ497758	0.0000

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
60	12-4 VLBF jan	uncultured bacterium; RP_3aaa01e03; EU471148	0.0058
		uncultured bacterium; RP_3aaa02b01; EU471256	0.0058
		uncultured bacterium; cc116; DQ057366	0.0029
		uncultured bacterium; RP_1aaa04a10; EU470583	0.0058
		uncultured bacterium; nbw117b05c1; GQ008426	0.0058
61	12-5 VLBF jan	uncultured eubacterium WD225; AJ292592	0.0099
		<i>Caulobacter sp.</i> A1; AF361188	0.0099
		drinking water bacterium Y7; AY328814	0.0099
		drinking water bacterium MA28; AY328836	0.0099
		uncultured bacterium; 625_A14_PCE_column_outflow; FM178815	0.0132
62	12-6 VLBF jan	uncultured bacterium; 21BSF45; AJ863265	0.0242
		uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; EB1091; AY395410	0.0272
		uncultured bacterium; FCPS428; EF516380	0.0272
		uncultured <i>alpha proteobacterium</i> CRIB-04; DQ123621	0.0121
		uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; Sliv-66; FM877652	0.0151
63	12-7 VLBF jan	bacterium Ellin6023; AY234675	0.0298
		uncultured bacterium; AKIW573; DQ129586	0.0430
		<i>Geodermatophilus</i> ; 33S, limestone, Negev desert, Israel; X92362	0.0298
		<i>Geodermatophilus</i> ; B-SWPS, rock varnish, Mojave desert, USA; X92363	0.0298
		uncultured actinobacterium; F11_7C FL; EF683016	0.0430
64	1-3 VLBF jan	<i>Acinetobacter johnsonii</i> ; P152; AF188300	0.0081
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> BioIuz K38; AF324538	0.0081
		<i>Acinetobacter johnsonii</i> ; SAFR-006; AY167841	0.0081
		<i>Acinetobacter sp.</i> An17; AJ551155	0.0081
		uncultured <i>Acinetobacter sp.</i> ; Lupin-1130m-1-MDA-ac1; EF205268	0.0081
65	1-4 VLBF jan	<i>Acinetobacter beijerinckii</i> ; type strain: NIPH 838 = LUH 4759; AJ626712	0.0236
		uncultured bacterium; 300A-B09; AY661997	0.0236
		uncultured bacterium; 789-1; AY994044	0.0236
		uncultured <i>Acinetobacter sp.</i> ; Lupin-1130m-1-MDA-ac1; EF205268	0.0236
		uncultured <i>Acinetobacter sp.</i> ; 3P-4-1-H15; EU706116	0.0197
66	1-5 VLBF jan	<i>Rhizobium sp.</i> 333; EU841542	0.0330
		AF364837	0.0330
		AF364838	0.0330
		AF364836	0.0330
		AF364839	0.0330
67	15-3 VLBF jan	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 1; LLAP 1; U64034	0.0139
		<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 14; LLAP-14; U66104	0.0056
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; ADK-BTe02-89; EF520560	0.0084
		uncultured soil bacterium; 1_H3; EU589279	0.0056
		uncultured <i>Legionella</i> sp.; MF40; FJ572668	0.0139

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
68	15-4 VLBF jan	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> (T); Bn9; Y07556 <i>Parachlamydia sp. Hall's coccus</i> ; AF366365 <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> ; Seine; DQ309029 <i>Parachlamydia sp.</i> OEW1; AM412760 endosymbiont of <i>Acanthamoeba sp.</i> EI1; AM408788	0.0928 0.0928 0.0928 0.0928 0.0928
69	15-8 VLBF jan	uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; LiUU-9-283; AY509406 uncultured <i>Rhodobacteraceae</i> bacterium; 022801; KL441HWDN22; DQ191822 uncultured bacterium; 2C229361; EU801059 uncultured bacterium; FGL7S_B54; FJ437940 <i>Rhodobacter sp.</i> LW4; FM956479	0.0543 0.0543 0.0543 0.0543 0.0435
70	1-6 VLBF jan	<i>Enterobacter sp. g1</i> ; DQ923474 uncultured bacterium; AFEL3_aao15d11; EU465992 uncultured bacterium; cc116; DQ057366 <i>Enterobacter sp.</i> 3242; DQ923475 uncultured bacterium; RP_1aaa04a10; EU470583	0.0033 0.0033 0.0033 0.0033 0.0065
71	16-3 VLBF jan	<i>Methylobacterium sp.</i> P1; AF148859 <i>Methylobacterium extorquens</i> ; ATCC14718; AF293375 <i>Methylobacterium extorquens</i> ; AF531770 <i>Methylobacterium extorquens</i> ; UCM B-3362; AY365229 <i>Methylobacterium sp.</i> iRII2; AY357997	0.0033 0.0033 0.0033 0.0033 0.0033
72	18-1 VLBF jan	human oral bacterium C20; AF202011 <i>Staphylococcus sp.</i> YSS/2001-5; AY057450 <i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> (T); ATCC 49326T; AB009937 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> ; ATCC 35844; D83355 <i>Staphylococcus epidermidis</i> ; ATCC 146 (= MAFF 911486); D83362	0.0064 0.0064 0.0064 0.0064 0.0064
73	18-2 VLBF jan	uncultured <i>Acinetobacter sp.</i> ; GI3-S-1-B08; FJ191708 <i>Enhydrobacter aerosaccus</i> (T); type strain: LMG 21877 = ATCC 27094; AJ550856 <i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; AHID8007; AY545637 <i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; 170804JB8; AY730714 <i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; AU1220; AY043376	0.0064 0.0064 0.0064 0.0064 0.0064
74	1-1 VLBF jul	uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1825; EU638332 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1834; EU638337 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1875; EU638370 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1919; EU638409 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1606; EU638463	0.0196 0.0196 0.0196 0.0196 0.0196
75	1-2 VLBF jul	uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1825; EU638332 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1834; EU638337 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1875; EU638370 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1919; EU638409 uncultured <i>Geobacillus sp.</i> ; SHBZ1606; EU638463	0.0397 0.0397 0.0397 0.0397 0.0397

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
76	1-3 VLBF jul	uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1825; EU638332	0.1569
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1834; EU638337	0.1569
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1875; EU638370	0.1569
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1919; EU638409	0.1569
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1606; EU638463	0.1569
77	1-4 VLBF jul	uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1825; EU638332	0.0145
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1834; EU638337	0.0145
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1875; EU638370	0.0145
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1919; EU638409	0.0145
		uncultured <i>Geobacillus</i> sp.; SHBZ1606; EU638463	0.0145
78	2-1 VLBF jul	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ; AY512821	0.0027
		uncultured sheep mite bacterium Llangefni 28; AF290483	0.0027
		uncultured sheep mite bacterium Llangefni 18; AF290484	0.0027
		uncultured sheep mite bacterium Llangefni 80; AF290485	0.0027
		<i>Phyllobacterium trifolii</i> (T); PETP02; AY786080	0.0027
79	2-2 VLBF jul	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> ; AY512821	0.0028
		uncultured sheep mite bacterium Llangefni 28; AF290483	0.0028
		uncultured sheep mite bacterium Llangefni 18; AF290484	0.0028
		uncultured sheep mite bacterium Llangefni 80; AF290485	0.0028
		<i>Phyllobacterium trifolii</i> (T); PETP02; AY786080	0.0028
80	2-4 VLBF jul	<i>Propionibacterium acnes</i> ; M61903	0.0000
		<i>Propionibacterium</i> sp. MSP09A; AB084066	0.0000
		<i>Propionibacterium acnes</i> ; #5317; AB108480	0.0000
		<i>Propionibacterium acnes</i> ; #1003; AB108483	0.0000
		<i>Propionibacterium acnes</i> ; #6119; AB108479	0.0000
81	3-1 VLBF jul	uncultured eubacterium; from Lake Gossenkoellesee; GKS16; AJ224987	0.0103
		uncultured bacterium; PIC-D9; AB252082	0.0103
		uncultured bacterium; PIC-D9; AM232820	0.0103
		uncultured <i>Comamonadaceae</i> bacterium; PIC-D9; DQ418529	0.0103
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; 162 T0h-oil; FM242208	0.0204
82	3-2 VLBF jul	uncultured <i>Acidovorax</i> sp.; 11.2-15; AJ543435	0.0000
		uncultured <i>Acidovorax</i> sp.; 4.7-1; AJ543436	0.0000
		uncultured earthworm intestine bacterium; wi89; AY154496	0.0000
		uncultured <i>Verminephrobacter</i> sp.; Lf1-4; FJ214170	0.0000
		uncultured <i>Verminephrobacter</i> sp.; LT; FJ214171	0.0000
83	3-3 VLBF jul	uncultured <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium; Amb_16S_1500; EF018981	0.0000
		uncultured <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium; Elev_16S_421; EF019244	0.0027
		uncultured bacterium; Pia-s-43; EF632934	0.0000
		uncultured <i>Burkholderiales</i> bacterium; CTRL50; EU404008	0.0000
		uncultured bacterium; p7l08ok; FJ479289	0.0000

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
84	3-7 VLBF jul	uncultured soil bacterium; 99; AY493947	0.0000
		uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; AKYG1828; AY921703	0.0000
		uncultured bacterium; B1_9R; AM157233	0.0000
		uncultured bacterium; B2_12BS; AM157333	0.0000
		uncultured <i>Oxalobacteraceae</i> bacterium; Amb_16S_419; EF018088	0.0000
85	5.1-4 VLBF jul	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; AU2418; AY486357	0.0155
		<i>Pseudomonas sp.</i> HMD H5; AB045280	0.0155
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; AB073312	0.0116
		<i>Pseudomonas sp.</i> SMCC B0138; AF500276	0.0155
		<i>Pseudomonas sp.</i> HF3-5; DQ288109	0.0155
86	5.1-5 VLBF jul	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; S1-9; AF448035	0.0054
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; HS-D38; DQ149582	0.0054
		uncultured bacterium; P6D102-554; EF510106	0.0027
		uncultured bacterium; P6D23-577; EF511028	0.0054
		<i>Pseudomonas sp.</i> 12B; FJ654699	0.0054
87	5.1-7 VLBF jul	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; S1-9; AF448035	0.0032
		uncultured bacterium; P7D1-497; EF509365	0.0032
		uncultured bacterium; P7D82-593; EF509460	0.0032
		uncultured bacterium; P6D102-554; EF510106	0.0000
		<i>Pseudomonas sp.</i> 12B; FJ654699	0.0032
88	5.2-1 VLBF jul	uncultured <i>Chlamydiales</i> bacterium; P-18; AF364572	0.0657
		<i>Candidatus Rhabdochlamydia porcellionis</i> (T); RKPsHep; AY223862	0.0610
		<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> ; CRIB01; AY928092	0.0654
		uncultured <i>Candidatus Rhabdochlamydia sp.</i> ; CN554; EU090707	0.0516
		uncultured <i>Candidatus Rhabdochlamydia sp.</i> ; CN808; EU090709	0.0657
89	10-2 VLBF jul	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
		uncultured bacterium; HTI; DQ497750	0.0000
		uncultured bacterium; HTK; DQ497758	0.0027
		uncultured bacterium; CVCloAm2Ph140; AM777958	0.0000
		uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium; OTU9/APA; 1B5; AM902634	0.0000
90	10-4 VLBF jul	uncultured bacterium; HB1; EF648015	0.0058
		uncultured bacterium; HB29; EF648040	0.0087
		uncultured bacterium; HB39; EF648048	0.0087
		uncultured bacterium; HB77; EF648075	0.0087
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; XJ105; EF648153	0.0058
91	12-1 VLBF jul	uncultured <i>Chryseobacterium sp.</i> ; GR2-36; DQ847444	0.0028
		CDC group II-h; NF 802; AM261868	0.0028
		<i>Chryseobacterium aquaticum</i> ; type strain: VR86; AM398648	0.0028
		<i>Chryseobacterium hominis</i> ; NF 1335; AM423079	0.0028
		<i>Chryseobacterium hominis</i> ; NF 696; AM423083	0.0028

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
92	12-2 VLBF jul	<i>Aerococcus viridans</i> ; 37R; AY707773	0.0056
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 88B; AY707774	0.0056
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 1032; AY707776	0.0056
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 1030; AY707775	0.0056
		uncultured bacterium; BF0002B069; AM697119	0.0056
93	12-3 VLBF jul	<i>Aerococcus sp.</i> LV65.5:W1; AF076639	0.0390
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 37R; AY707773	0.0390
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 88B; AY707774	0.0390
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 1030; AY707775	0.0390
		uncultured bacterium; obob2_aaa04c12; EF096525	0.0390
94	14-2 VLBF jul	denitrifying bacterium W125; AB162105	0.0000
		uncultured bacterium; AKAU4130; DQ125880	0.0000
		uncultured bacterium; JFJ-ICE-Bact-28; AJ867658	0.0000
		<i>Methylibium fulvum</i> ; Gsoil 322; AB245356	0.0000
		uncultured bacterium; 110ds10; AY212562	0.0000
95	14-3 VLBF jul	denitrifying bacterium W125; AB162105	0.0000
		uncultured bacterium; AKAU4130; DQ125880	0.0000
		uncultured bacterium; JFJ-ICE-Bact-28; AJ867658	0.0000
		uncultured bacterium; LO13.11; AF358003	0.0000
		uncultured bacterium; 110ds10; AY212562	0.0000
96	14-4 VLBF jul	<i>Acidovorax sp.</i> UFZ-B517; AF235010	0.0108
		<i>Acidovorax facilis</i> (T); CCUG 2113; AF078765	0.0108
		<i>Acidovorax sp.</i> R12-10; AY618577	0.0108
		drinking water bacterium M2; DQ202404	0.0108
		<i>Acidovorax facilis</i> ; LMG 2193; EU024133	0.0108
97	15-3 VLBF jul	uncultured bacterium; 005C-F01; AY662015	0.0000
		<i>Aquabacterium commune</i> (T); B8; AF035054	0.0000
		<i>Leptothrix cholodnii</i> ; CCM 1827; X97070	0.0000
		uncultured eubacterium WD2102; AJ292626	0.0000
		<i>Leptothrix discophora</i> ; SP-6; L33974	0.0000
98	16-2 VLBF jul	uncultured sludge bacterium A37; AF234753	0.0039
		uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; AS12; EU283352	0.0039
		<i>Pelomonas sp.</i> On15; DQ291149	0.0039
		<i>beta proteobacterium</i> IMCC1733; DQ664247	0.0039
		<i>beta proteobacterium</i> IMCC1718; DQ664252	0.0039
99	16-4 VLBF jul	<i>Agrococcus jenensis</i> (T); DSM 9580; X92492	0.0140
		<i>Corynebacterium cf. aquaticum</i> V4.BO.26; V4.BO.26 = MM_2933; AJ244681	0.0112
		<i>Agrococcus sp.</i> Bt 15; AJ971867	0.0112
		<i>Corynebacteriaceae</i> bacterium NR121; DQ520815	0.0112
		uncultured bacterium; FC01D09; FM873049	0.0140

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
100	18-2 VLBF jul	<i>Acidovorax facilis</i> (T); CCUG 2113; AF078765 drinking water bacterium M2; DQ202404 <i>Acidovorax facilis</i> ; LMG 2193; EU024133 uncultured <i>Delftia</i> sp.; GI3-S-1-H03; FJ191754 uncultured <i>Delftia</i> sp.; GI3-M-7-C02; FJ192038	0.0138 0.0138 0.0138 0.0138 0.0138
101	18-3 VLBF jul	uncultured bacterium; 1304; AB286471 uncultured bacterium; 1330; AB uncultured bacterium; 1405; AB286519 <i>Brachymonas petroleovorans</i> ; CHX; AY275432 uncultured bacterium; 26-H; AB274848	0.0083 0.0083 0.0083 0.0000 0.0055
102	1-1 VLBF okt	<i>Paracoccus yeei</i> ; AY528674 <i>Paracoccus yeei</i> ; G4878; AY014168 <i>Paracoccus yeei</i> ; G6446; AY014169 <i>Paracoccus yeei</i> ; G6155; AY014170 <i>Paracoccus yeei</i> ; G1968; AY014171	0.0060 0.0060 0.0060 0.0060 0.0060
103	1-3 VLBF okt	<i>Paracoccus yeei</i> ; AY528674 <i>Paracoccus yeei</i> ; G4878; AY014168 <i>Paracoccus yeei</i> ; G6446; AY014169 <i>Paracoccus yeei</i> ; G6155; AY014170 <i>Paracoccus yeei</i> ; G1968; AY014171	0.0031 0.0031 0.0031 0.0031 0.0031
104	1-4 VLBF okt	<i>Paracoccus yeei</i> ; AY528674 <i>Paracoccus yeei</i> ; G4878; AY014168 <i>Paracoccus yeei</i> ; G6446; AY014169 <i>Paracoccus yeei</i> ; G6155; AY014170 <i>Paracoccus yeei</i> ; G1968; AY014171	0.0000 0.0000 0.0000 0.0000 0.0000
105	2-1 VLBF okt	uncultured bacterium; EV818CFSSAHH220; DQ337020 <i>Acinetobacter parvus</i> (T); LUH4616 (Aci602); AJ293691 <i>Acinetobacter parvus</i> ; LUH3313 (Aci 583); AJ293690 uncultured bacterium; SSmCB08-21; AB176188 uncultured bacterium; P6D1-547; EF510269	0.0833 0.0833 0.0833 0.0833 0.0833
106	2-3 VLBF okt	<i>Pseudomonadaceae</i> bacterium E7; AF539761 uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; Gitt-GS-123; AJ582197 <i>Pseudomonas</i> sp. D6; AY576004 <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> ; BI; AF439803 uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. KF/GS-Gitt2-53; AJ295645	0.0057 0.0057 0.0057 0.0057 0.0057
107	2-5 VLBF okt	<i>Rheinheimera baltica</i> ; OS 140; Baltic # 166; AJ002006 <i>Rheinheimera baltica</i> ; OSBAC5; AJ441082 <i>Rheinheimera</i> sp. 3006; AM110966 <i>Rheinheimera baltica</i> (T); OSBAC1; AJ441080 uncultured bacterium; MC1_16S_55; EU662624	0.0172 0.0172 0.0172 0.0172 0.0172
108	3-1 VLBF okt	uncultured bacterium; 654987; DQ404656 uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; 61-01-24c011; DQ316808 uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; 61-01-24c035; DQ316816 uncultured <i>Caulobacter</i> sp.; Plot29-2D07; EU202832 iron-reducing bacterium enrichment culture clone HN72; FJ269066	0.0032 0.0032 0.0065 0.0357 0.0065

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
109	4-1 VLBF okt	uncultured bacterium; G4; AY706415	0.0000
		uncultured bacterium; G3; AY706420	0.0000
		uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; B-BH93; AY622261	0.0000
		<i>Janthinobacterium sp.</i> Tibet-IIK43; DQ177470	0.0000
		uncultured bacterium; FCPO523; EF516378	0.0000
110	5-7 VLBF okt	<i>Pseudomonadaceae</i> bacterium E7; AF539761	0.0000
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; Gitt-GS-123; AJ582197	0.0000
		<i>Pseudomonas sp.</i> DY-A; AJ544239	0.0000
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; Gitt-KF-111; AJ532693	0.0000
		<i>Pseudomonas sp.</i> D6; AY576004	0.0000
111	5.2-4 VLBF okt	uncultured bacterium; KRA30-19; AY081990	0.0035
		bacterium FK1; EF462373	0.0035
		uncultured bacterium; nbt28c04; EU535624	0.0035
		uncultured bacterium; nbt250a01; EU536723	0.0035
		uncultured bacterium; nbt243b12; EU539628	0.0035
112	5.2-5 VLBF okt	uncultured bacterium; SX2-3; DQ469202	0.0030
		uncultured bacterium; nbt77b11; EU537350	0.0030
		uncultured bacterium; G24; DQ480483	0.0030
		uncultured bacterium; nbt95f09; EU538944	0.0030
		uncultured bacterium; nbt135a02; FJ894777	0.0030
113	10-2 VLBF okt	uncultured bacterium; ANTLV1_D04; DQ521483	0.0036
		uncultured bacterium; ANTLV1_H04; DQ521497	0.0036
		<i>Salinibacterium sp.</i> 18III/A01/077; AY576726	0.0000
		uncultured bacterium; ANTLV1_B10; DQ521476	0.0036
		<i>Leifsonia sp.</i> MSL 07; EF466130	0.0000
114	12-1 VLBF okt	<i>Acinetobacter baumannii</i> ; DSM 30008; X81667	0.0111
		<i>Acinetobacter baumannii</i> (T); DSM 30007; X81660	0.0111
		<i>Acinetobacter baumannii</i> ; KF714; AB109775	0.0111
		<i>Acinetobacter baumannii</i> ; ATCC 19606T; DNA group two; Z93435	0.0111
		<i>Acinetobacter baumannii</i> ; 29108 CMCC(B); AY738399	0.0111
115	12-3 VLBF okt	uncultured bacterium; MD03D02; FM874461	0.0095
		uncultured bacterium; SC04A05; FM875311	0.0095
		uncultured bacterium; SC04F05; FM875473	0.0095
		uncultured bacterium; nbw782g06c1; GQ010094	0.0095
		uncultured bacterium; nbu115h04c1; GQ017094	0.0047
116	12-5 VLBF okt	<i>Aerococcus viridans</i> ; 37R; AY707773	0.0143
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 88B; AY707774	0.0143
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 1030; AY707775	0.0143
		<i>Aerococcus viridans</i> ; 1032; AY707776	0.0143
		<i>Aerococcus viridans</i> ; ATCC 10400; AY707777	0.0143
117	14-1 VLBF okt	<i>Rhodococcus sp.</i> MBIC01430; MBIC 01430; AB088667	0.0096
		<i>Rhodococcus sp.</i> 11/8p; DQ310478	0.0096
		<i>Rhodococcus sp.</i> ZS1-20; FJ195991	0.0096
		<i>Rhodococcus sp.</i> ZS2-21; FJ195998	0.0096
		<i>Rhodococcus sp.</i> ZS1-27; FJ889669	0.0096

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
118	15-1 VLBF okt	uncultured bacterium; P9X2b3D10; EU491124	0.0314
		uncultured bacterium; P9X2b7F11; EU491207	0.0314
		uncultured bacterium; P9X2b8E05; EU491308	0.0314
		uncultured bacterium; P9X2b8D02; EU491303	0.0314
		uncultured bacterium; TS-15; FJ535352	0.0314
119	15-2 VLBF okt	<i>Legionella feeleii</i> ; serogroup 2, ntc 11978; Z49740	0.0541
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; ADK-BTe02-89; EF520560	0.0378
		uncultured soil bacterium; 1_H3; EU589279	0.0378
		uncultured bacterium; nbw777c06c1; GQ009498	0.0541
		uncultured bacterium; nbw779g03c1; GQ009814	0.0541
120	15-3 VLBF okt	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 1; LLAP 1; U64034	0.0140
		<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 14; LLAP-14; U66104	0.0056
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; ADK-BTe02-89; EF520560	0.0084
		uncultured soil bacterium; 1_H3; EU589279	0.0056
		uncultured <i>Legionella</i> sp.; MF40; FJ572668	0.0140
121	15-4 VLBF okt	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 1; LLAP 1; U64034	0.0126
		<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 14; LLAP-14; U66104	0.0031
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; ADK-BTe02-89; EF520560	0.0063
		uncultured soil bacterium; 1_H3; EU589279	0.0031
		uncultured <i>Legionella</i> sp.; MF40; FJ572668	0.0094
122	15-5 VLBF okt	<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 1; LLAP 1; U64034	0.0169
		<i>Legionella</i> -like amoebal pathogen 14; LLAP-14; U66104	0.0169
		uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; ADK-BTe02-89; EF520560	0.0112
		uncultured soil bacterium; 1_H3; EU589279	0.0112
		uncultured <i>Legionella</i> sp.; MF40; FJ572668	0.0169
123	15-6 VLBF okt	uncultured <i>gamma proteobacterium</i> ; MP1-2H; DQ366011	0.0327
		uncultured bacterium; P9X2b3D10; EU491124	0.0288
		uncultured bacterium; P9X2b7F11; EU491207	0.0288
		uncultured bacterium; P9X2b8D02; EU491303	0.0288
		uncultured bacterium; P9X2b8E05; EU491308	0.0288
124	16-1 VLBF okt	<i>Corynebacterium cf. aquaticum</i> V4.BO.26; V4.BO.26 = MM_2933; AJ244681	0.0034
		<i>Agrococcus</i> sp. Bt 15; AJ971867	0.0034
		<i>Agrococcus lahaulensis</i> (T); K22-21; DQ156908	0.0068
		<i>Corynebacteriaceae</i> bacterium NR121; DQ520815	0.0034
		<i>Agrococcus jenensis</i> ; XJU-1; EF672044	0.0068
125	18-2 VLBF okt	uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; B-N19; AY622246	0.0000
		uncultured bacterium; BF23; DQ327689	0.0000
		uncultured bacterium; M0111_06; EU104010	0.0000
		uncultured bacterium; M0111_10; EU104014	0.0000
		uncultured bacterium; JH-WH45; EF492894	0.0000

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
126	18-6 VLBF okt	uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; B-N19; AY622246	0.0245
		<i>Aquabacterium parvum</i> (T); B6; AF035052	0.0245
		uncultured bacterium; BF23; DQ327689	0.0245
		uncultured bacterium; nbt214g11; EU536498	0.0245
		uncultured bacterium; nbt17c05; FJ893241	0.0245
127	1-1 ZEL apr	uncultured bacterium; B1NR70D6; AY957891	0.0475
		uncultured bacterium; EV818CFSSAH60; DQ337000	0.0712
		uncultured bacterium; SWB03; AB294314	0.0475
		uncultured bacterium; SC\38; EU340216	0.0542
		uncultured bacterium; 1T03; EU835393	0.0508
128	1-8 ZEL apr	uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0481
		uncultured bacterium; SDKAS1_13; AY734241	0.0778
		uncultured bacterium; Biofilm_256d_c16; DQ058677	0.0852
		uncultured bacterium; Biofilm_94d_c2; DQ058678	0.0815
		uncultured bacterium; P9X2b3C09; EU491114	0.0778
129	2-1 ZEL apr	uncultured bacterium; B1NR70D6; AY957891	0.0268
		uncultured bacterium; EV818CFSSAH60; DQ337000	0.0502
		uncultured bacterium; SWB03; AB294314	0.0268
		uncultured bacterium; SC\38; EU340216	0.0334
		uncultured bacterium; 1T03; EU835393	0.0334
130	3-2 ZEL apr	endosymbiont of <i>Acanthamoeba sp.</i> UWC22; AF083616	0.0774
		endosymbiont of <i>Acanthamoeba sp.</i> TUME1; AF098330	0.0774
		<i>Waddlia sp.</i> G817; AY184804	0.0801
		uncultured <i>Waddlia sp.</i> ; CN761; EU090708	0.0801
		<i>Chlamydiales</i> bacterium CRIB 32; EU363464	0.0325
131	3-14 ZEL apr	uncultured bacterium; Cc3-109; AB299562	0.1013
		uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0570
		uncultured bacterium; Biofilm_256d_c16; DQ058677	0.0506
		uncultured bacterium; Biofilm_94d_c2; DQ058678	0.0506
		uncultured bacterium; P9X2b3C09; EU491114	0.0506
132	4-6 ZEL apr	<i>Bdellovibrio sp.</i> JSS; EF687743	0.0149
		uncultured bacterium; 3BR-7F; EU937856	0.0149
		uncultured bacterium; FOOS7B_64; EU431712	0.0149
		uncultured bacterium; FOOS7B_70; EU431717	0.0149
		uncultured bacterium; Foos8B_33; EU431780	0.0149
133	4-8 ZEL apr	uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; ATB-LH-6000; FJ535147	0.0219
		uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; ATB-LH-7183; FJ535164	0.0219
		uncultured soil bacterium; UC8; DQ248257	0.0219
		<i>Variovorax paradoxus</i> ; CAI-26; DQ257419	0.0219
		uncultured bacterium; 17up; AY212631	0.0219
134	5-7 ZEL apr	uncultured <i>Nitrospira sp.</i> ; I11F; FJ205367	0.0933
		uncultured bacterium; IheB3-8; AB099986	0.1000
		uncultured bacterium; IndB4-27; AB100014	0.0940
		uncultured bacterium; 1013-28-CG57; AY532591	0.1333
		uncultured bacterium; SDKAS1_8; AY734239	0.0132

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
135	5.1-1 ZEL jan	endosymbiont of <i>Acanthamoeba sp.</i> UWC22; AF083616	0.0871
		<i>Waddlia chondrophila</i> ; 2032/99; AF346001	0.0928
		<i>Waddlia sp.</i> G817; AY184804	0.0898
		uncultured <i>Waddlia sp.</i> ; CN761; EU090708	0.0898
		<i>Chlamydiales</i> bacterium CRIB 32; EU363464	0.0358
136	1.2-2 ZEL jan	uncultured <i>beta proteobacterium</i> ; JG37-AG-125; AJ518783	0.0513
		uncultured bacterium; FCPS411; EF516709	0.0549
		uncultured bacterium; FCPT435; EF515951	0.0549
		uncultured bacterium; p11i16ok; FJ479082	0.0549
		uncultured bacterium; p11e02ok; FJ479343	0.0549
137	2.1-2 ZEL jan	<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; 5873; AF005190	0.0055
		<i>Moraxella (Moraxella) osloensis</i> ; LBS6; EU400648	0.0055
		uncultured bacterium; nbw111a03c1; GQ007896	0.0055
		uncultured bacterium; nbw111f02c1; GQ007948	0.0055
		uncultured bacterium; nbw113h08c1; GQ008133	0.0055
138	3.2-3 ZEL jan	uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium; FTL227; AF529104	0.0385
		uncultured bacterium; 1333; AB286500	0.0356
		uncultured bacterium; BacA_072; EU335292	0.0326
		uncultured bacterium; 17C1R; FJ004647	0.0386
		uncultured bacterium; C123; FJ466227	0.0356
139	3.2-4 ZEL jan	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
		uncultured bacterium; HTI; DQ497750	0.0000
		uncultured bacterium; HTK; DQ497758	0.0000
		uncultured bacterium; CVCloAm2Ph140; AM7	0.0000
		uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium; OTU9/APA; 1B5; AM902634	0.0000
140	3.2-5 ZEL jan	uncultured bacterium; HTH; DQ497748	0.0000
		uncultured bacterium; HTI; DQ497750	0.0000
		uncultured bacterium; HTK; DQ497758	0.0000
		uncultured bacterium; CVCloAm2Ph140; AM777958	0.0000
		uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium; OTU9/APA; 1B5; AM902634	0.0000
141	3.2-8 ZEL jan	<i>alpha proteobacterium</i> P-61; AM411928	0.0484
		<i>Candidatus Reyranella massiliensis</i> ; URTM1; EF394922	0.0430
		uncultured bacterium; p5j06ok; FJ479332	0.0430
		uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; AMJD5; AM934883	0.0430
		uncultured <i>alpha proteobacterium</i> ; delph1H5; FM209093	0.0430
142	3.2-9 ZEL jan	uncultured bacterium; p7j18ok; FJ478824	0.0702
		<i>alpha proteobacterium</i> KC-IT-H9; FJ711207	0.0439
		<i>alpha proteobacterium</i> KC-EP-S12; FJ711215	0.0439
		<i>alpha proteobacterium</i> KC-EP-S5; FJ711221	0.0439
		<i>alpha proteobacterium</i> KC-IT-F7; FJ711199	0.0439

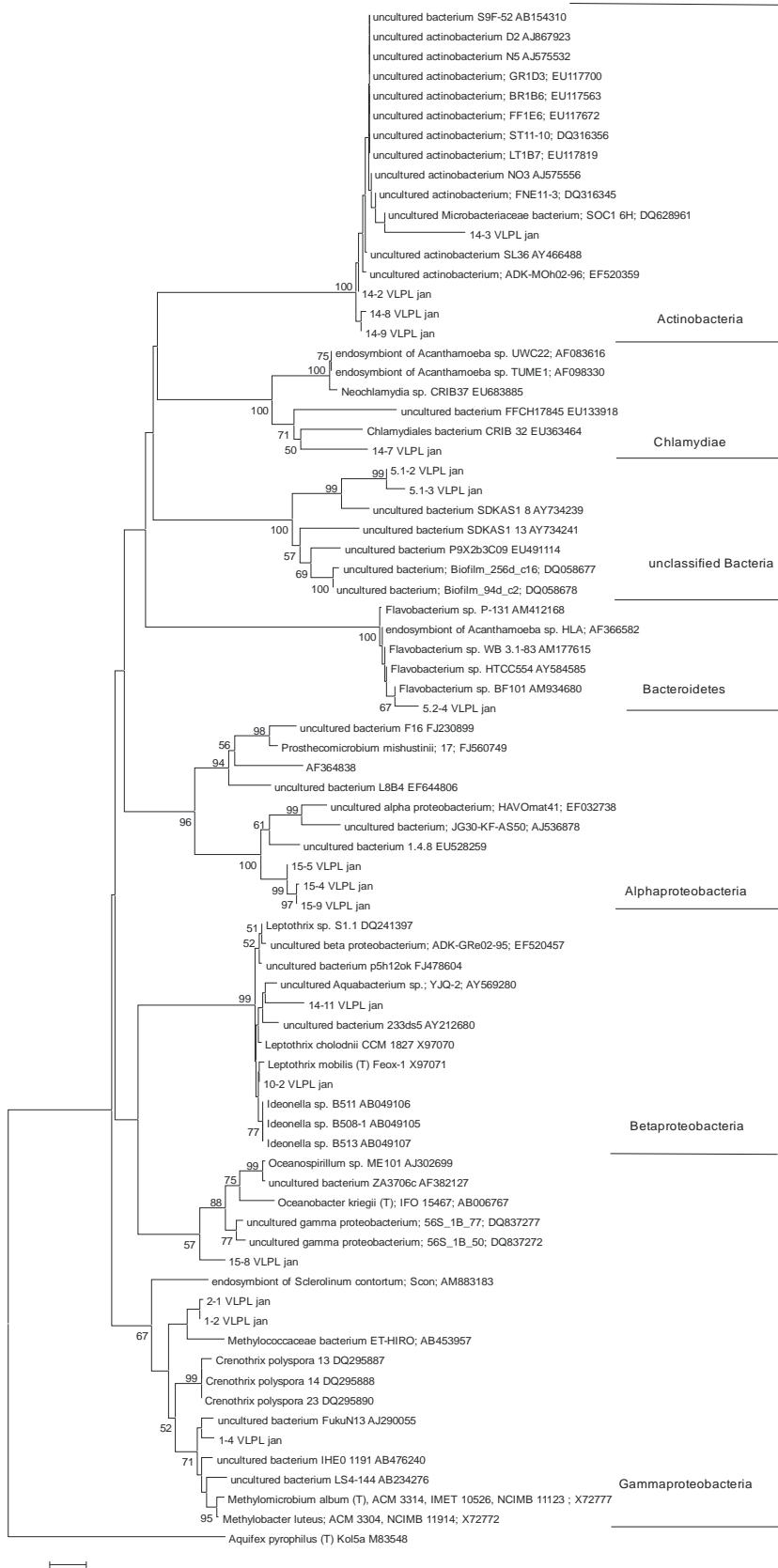
se nadaljuje

nadaljevanje

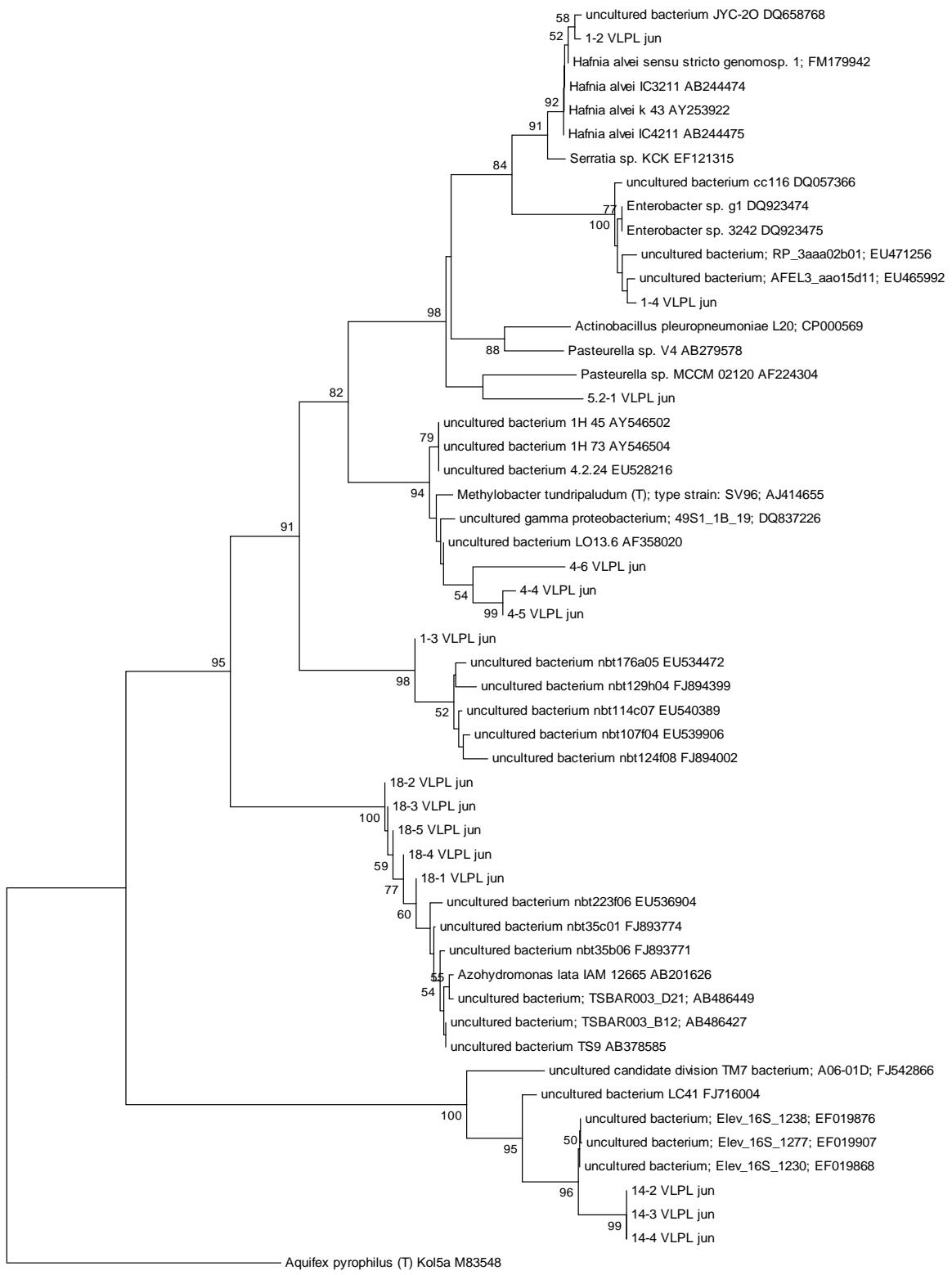
Oznaka fragmenta na TGGE gelu	Ime vzorca	5 najbližjih sorodnikov iz RDP baze (Ribosomal Database Project)	p-razlika
143	3.3-6 ZEL jan	<i>Stenotrophomonas sp.</i> Lm-610; EF025344	0.0027
		<i>Vibrio sp.</i> ZX-PKU-010; DQ912808	0.0027
		<i>Stenotrophomonas sp.</i> Da-16; EU073955	0.0000
		<i>Pseudomonas sp.</i> X10; EU285592	0.0027
		<i>Stenotrophomonas sp.</i> HB; EU288190	0.0027
144	4.2-5 ZEL jan	uncultured bacterium; HOClCi25; AY328574	0.0029
		uncultured bacterium; HOClCi59; AY328608	0.0029
		uncultured bacterium; HOClCi71; AY328620	0.0029
		uncultured bacterium; DSSD13; AY328712	0.0029
		uncultured bacterium; I12; AY187895	0.0029
145	4.3-3 ZEL jan	uncultured bacterium; G13; AF407700	0.0418
		uncultured bacterium GR-WP33-30; AJ296569	0.0628
		uncultured <i>delta proteobacterium</i> ; HAVomat133; EF032749	0.0669
		uncultured <i>delta proteobacterium</i> ; HAVomat82; EF032751	0.0628
		uncultured <i>Acidobacteriales</i> bacterium; Plot29-2C01; EU202756	0.0753
146	5.1-2 ZEL jan	<i>Denitromonas aromaticus</i> ; AS-7; AB049763	0.0630
		<i>Denitromonas indolicum</i> ; MPKc; AY972852	0.0630
		uncultured bacterium; FS274-35B-03; DQ513098	0.0630
		<i>Denitromonas sp.</i> D1-68; AM403170	0.0630
		<i>Denitratisoma oestradiolicum</i> (T); AcBE2-1; AY879297	0.0630
147	6.1-1 ZEL jan	endosymbiont of <i>Acanthamoeba sp.</i> EI6; AM408793	0.0300
		uncultured <i>Chlamydiales</i> bacterium; P-19; AF364573	0.0300
		<i>Rhabdochlamydia crassificans</i> ; CRIB01; AY928092	0.0300
		uncultured <i>Chlamydia sp.</i> ; PRPR10; DQ903988	0.0100
		<i>Chlamydiales</i> bacterium CRIB33; EU683887	0.0200

Priloga E: Filogenetska drevesa

Za vsa 16S rRNK zaporedja določena z sekvenciranjem in zaporedja njihovih 5 filogenetskih najbližjih sorodnikov iz RDP 10 podatkovne baze, smo za vsak TGGE gel posebej izrisali filogenetska drevesa. Izrisali smo jih s programskim paketom MEGA 4.0 (Tamura in sod., 2007) z metodo povezovanja sosedov (Neighbour-joining) na podlagi Kimurinega dvoparametričnega modela, kvaliteto dreves pa smo ocenili z metodo vezanja (bootstrap) pri 1000 ponovitvah dreves (bootstrap vrednosti pod 50 na slikah niso prikazane). Pet filogenetsko najbližjih sorodnikov za vsa naša zaporedja in izračunane p-razlike so prikazane v prilogi D.

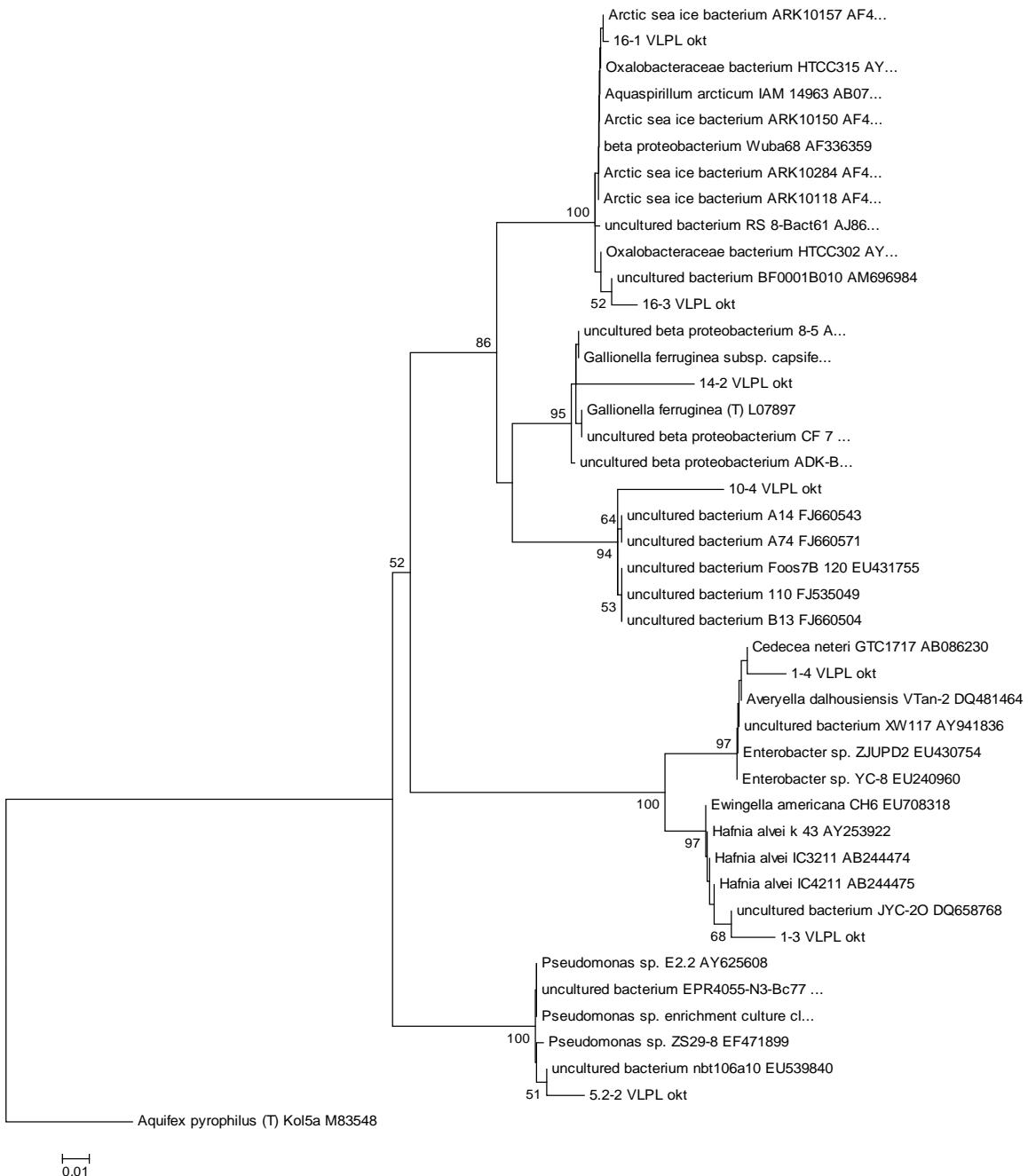


Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz planktonskih bakterijskih združb januarja (VS na Dolenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki

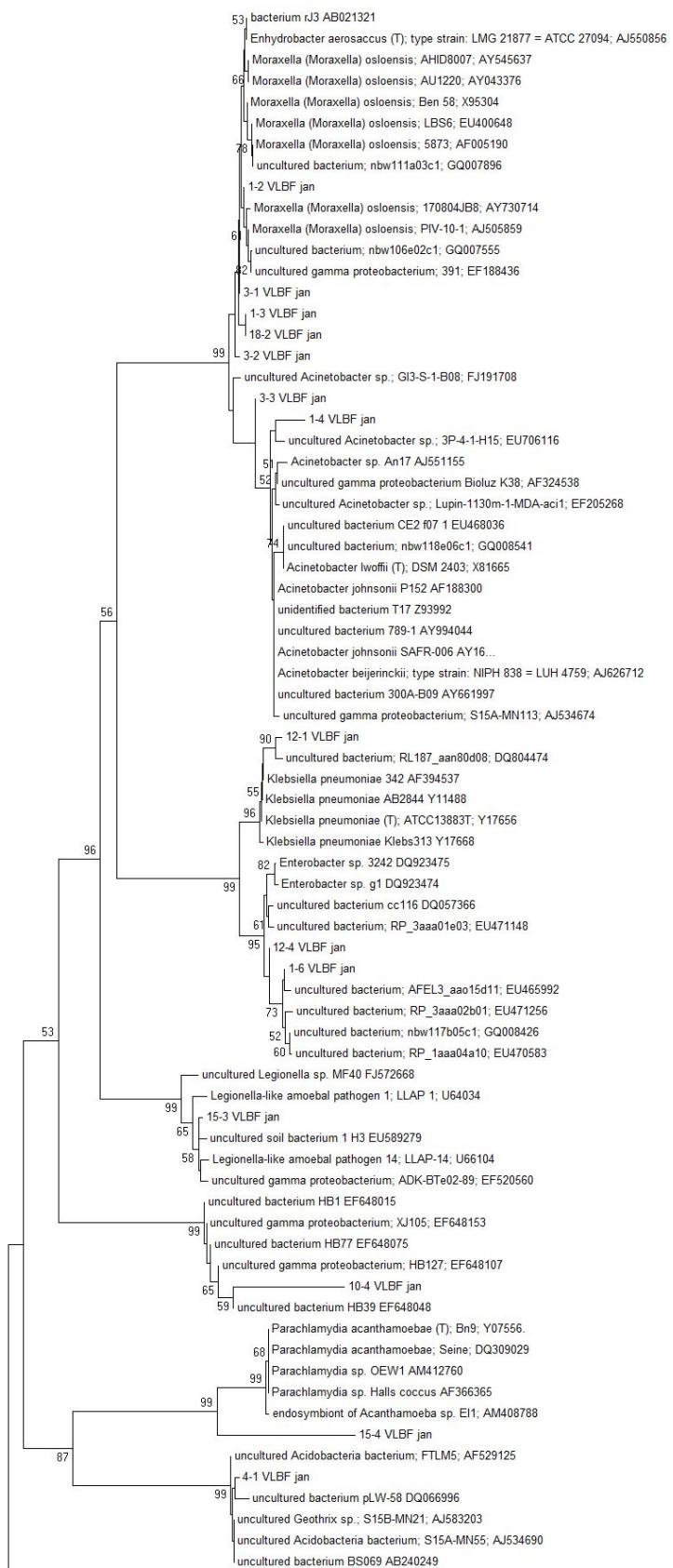


Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz planktonskih bakterijskih združb julija (VS na Dolenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki

0.01

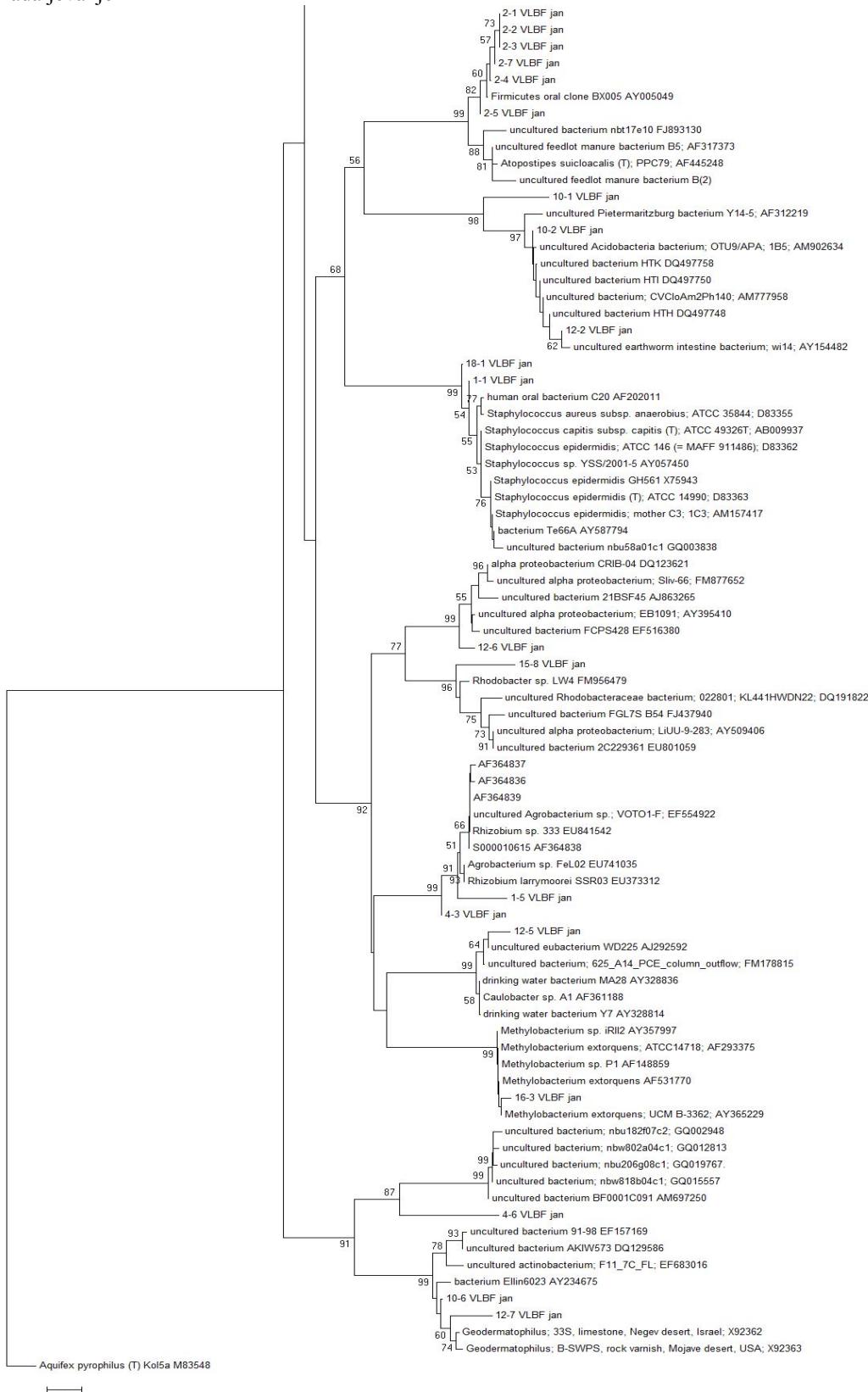


Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz planktonskih bakterijskih združb oktobra (VS na Dolenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki

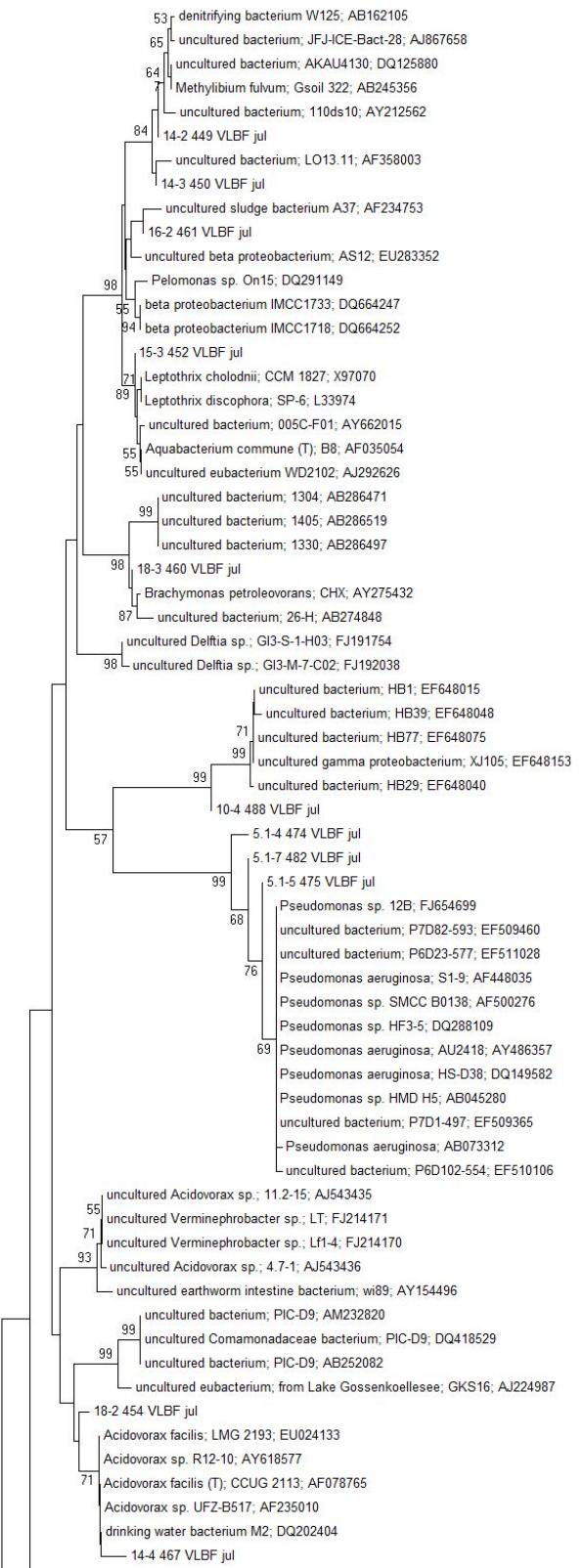


se nadaljuje

nadaljevanje

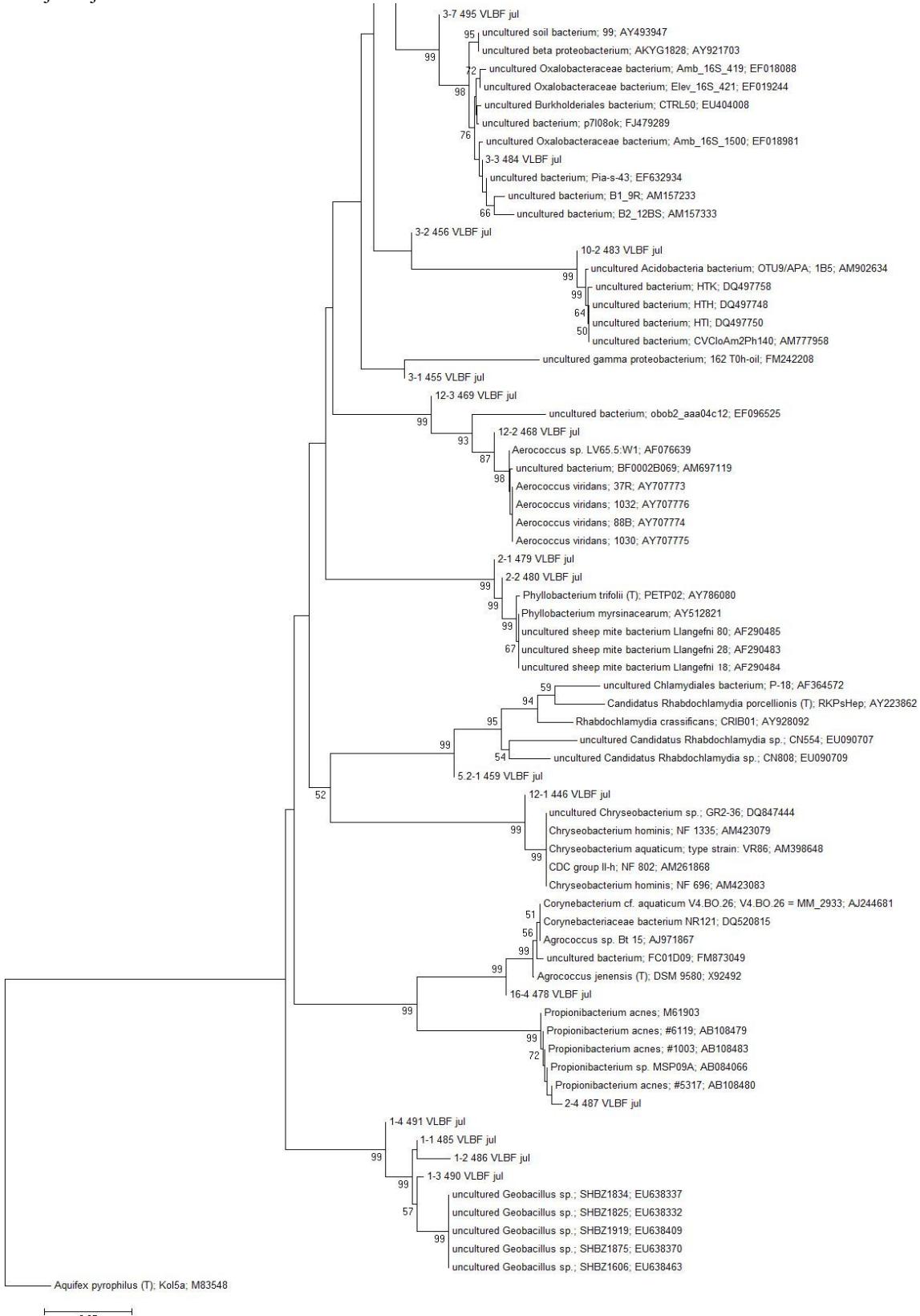


Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz pritrjenih bakterijskih združb januarja (VS na Dolenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki

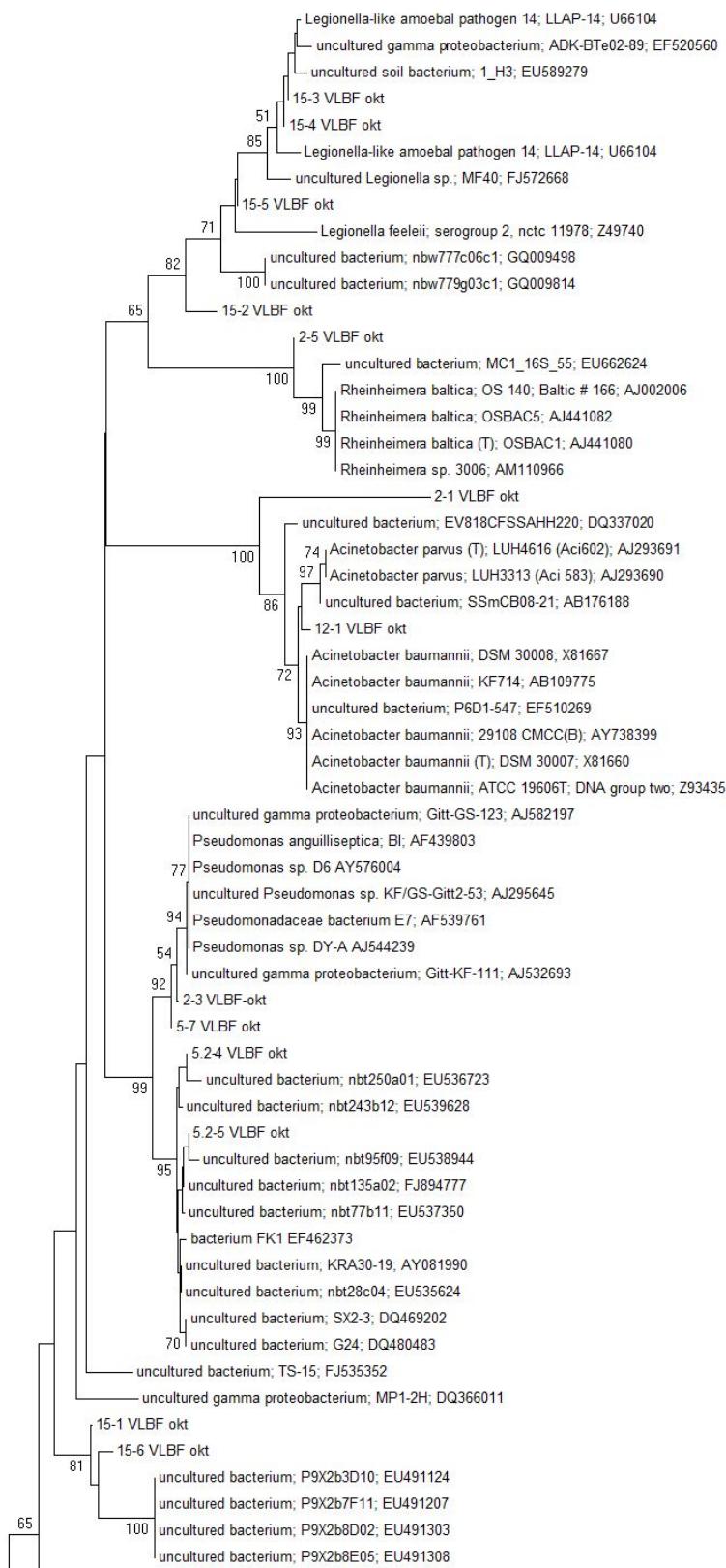


se nadaljuje

nadaljevanje

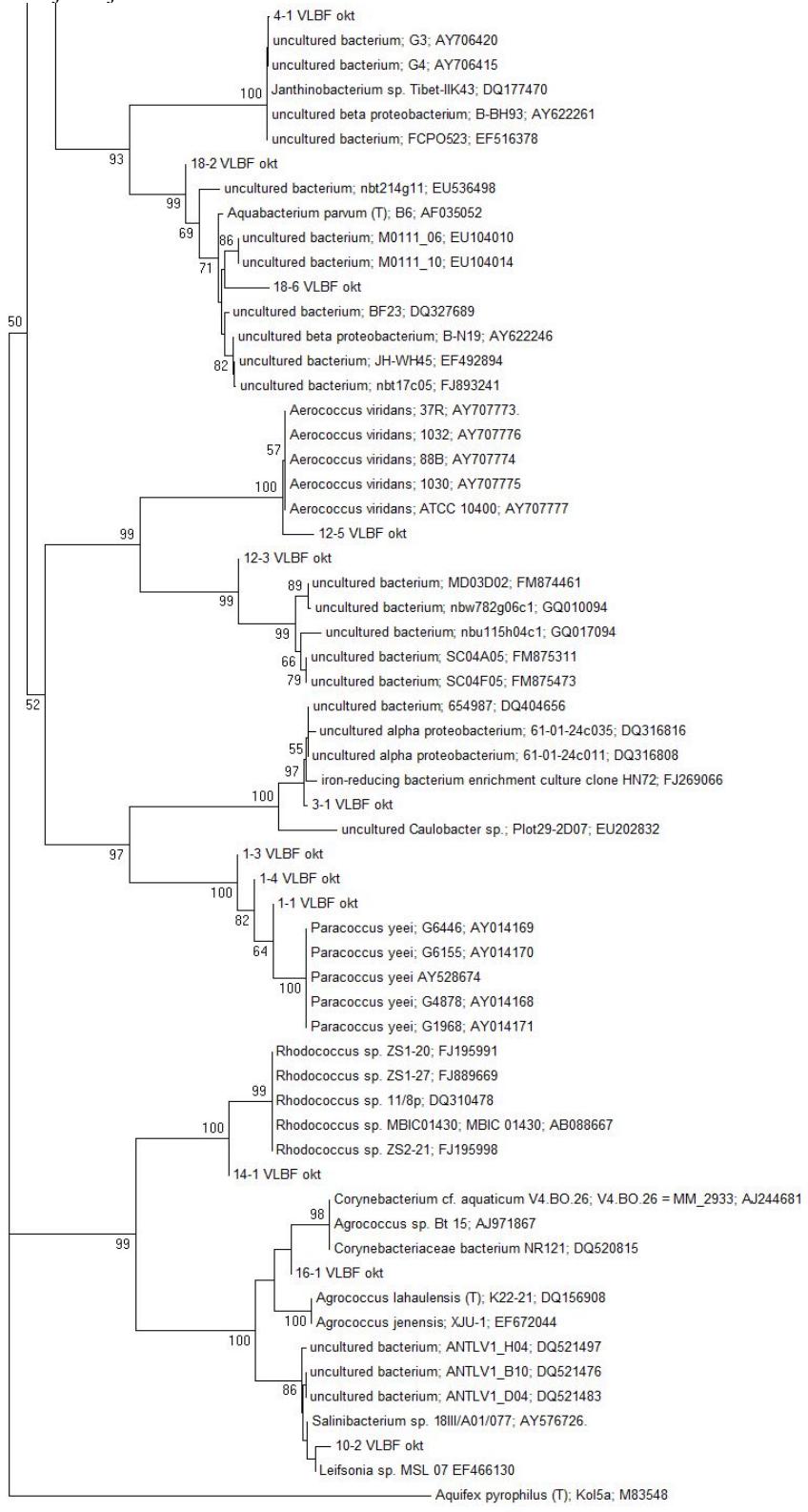


Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz pritrjenih bakterijskih združb julija (VS na Dolenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki

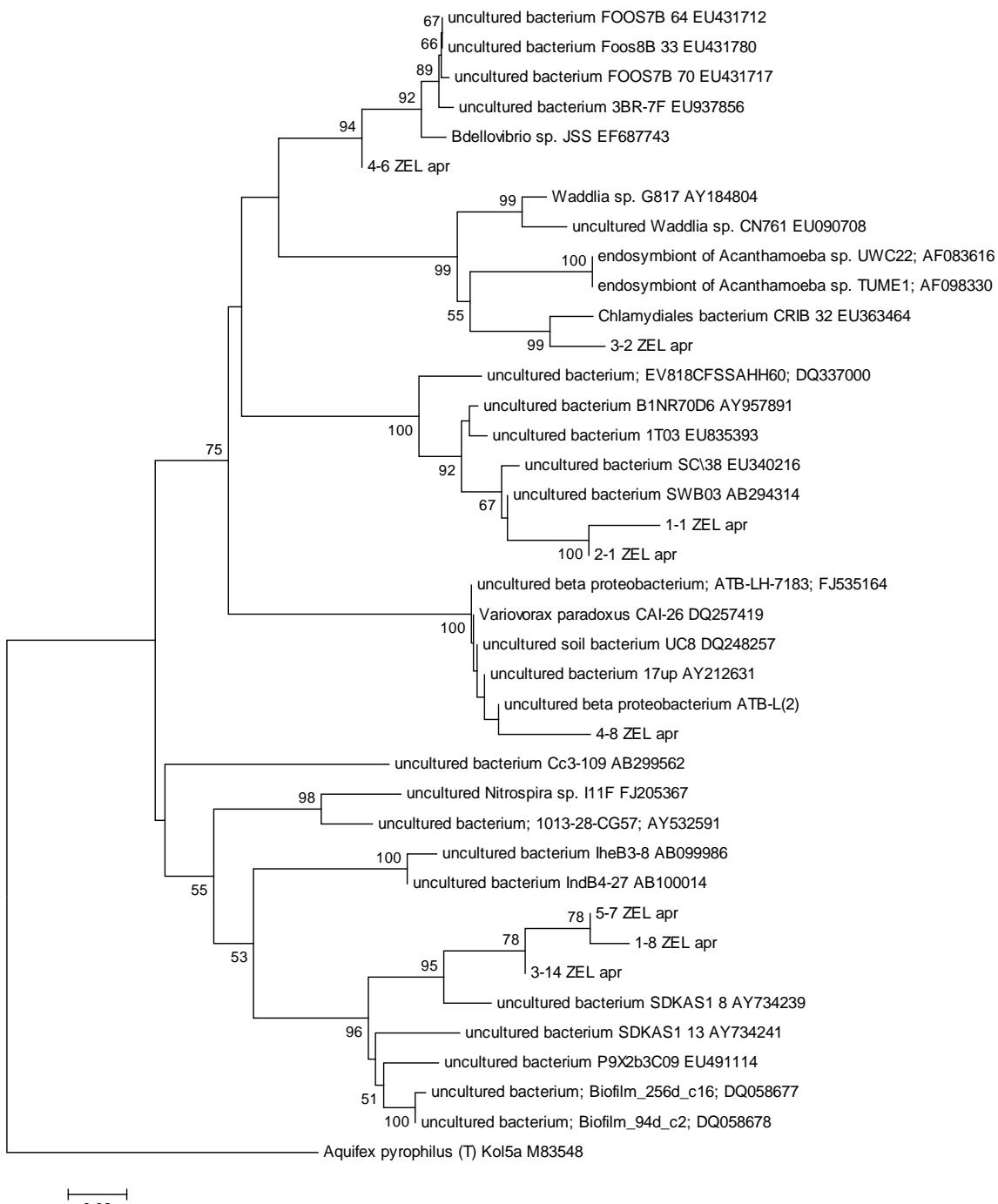


se nadaljuje

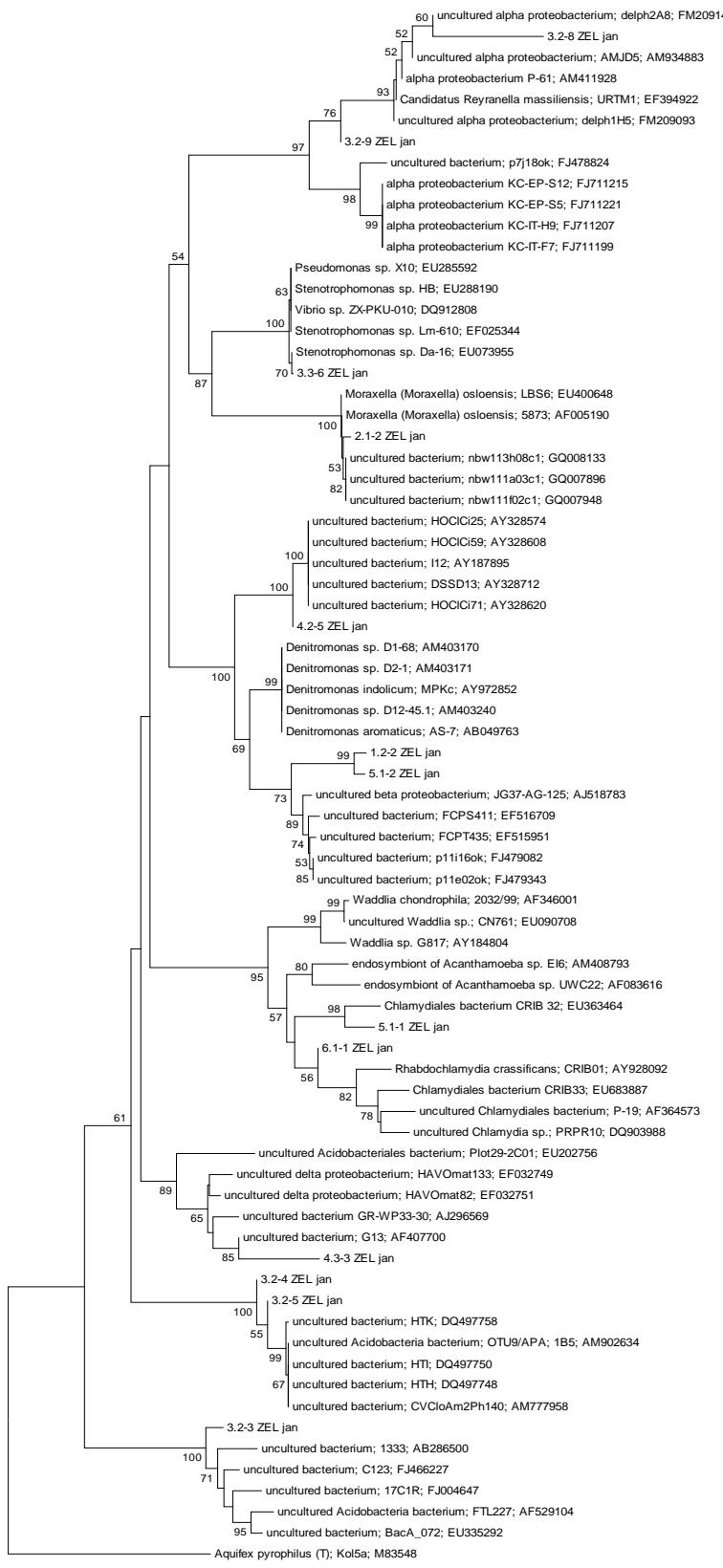
nadaljevanje



Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz pritrjenih bakterijskih združb oktobra (VS na Dolenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki



Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz planktonskih bakterijskih združb aprila 2008 (VS na Gorenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki



Filogenetsko drevo razmerij med 16S rRNK zaporedji izoliranimi iz planktonskih bakterijskih združb januarja 2009 (VS na Gorenjskem) in njihovimi najbližjimi sorodniki

Priloga F:

Mikrobiološki parametri, ki smo jih preverjali, in njihove mejne vrednosti določene s Pravilnikom o pitni vodi (2004)

Parameter	Mejna vrednost parametra
<i>Escherichia coli</i>	0/100 mL
enterokoki	0/100 mL
število kolonij pri 22°C	100/ mL
število kolonij pri 37°C	20/ mL

Priloga G:

Rezultati kemijske analize vzorcev vode iz vodovodnih sistemov. Analize je opravil Inštitut za varovanje zdravja RS.

Kemijski parametri vzorcev iz VS na Dolenjskem. Mejne vrednosti so povzete po Pravilniku o pitni vodi (2004). Najvišje vrednosti parametrov so poudarjene.

Kemijski parametri analize vzorcev iz VS na Gorenjskem. Mejne vrednosti so povzete po Pravilniku o pitni vodi (2004). Najvišje vrednosti parametrov so povendarjene.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Martin ŠTIMPFEL

**MOLEKULARNO BIOLOŠKA ANALIZA
PLANKTONSKIH IN PRITRJENIH BAKTERIJSKIH
ZDRUŽB V LOKALNEM VODOVODNEM SISTEMU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij