

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra ZEME

**VPLIV FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN NA STRUKTURO
NITRIFIKACIJSKE ZDRUŽBE V AKTIVNEM BLATU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF PHARMACEUTICAL RESIDUES ON THE
STRUCTURE OF ACTIVATED SLUDGE NITRIFYING COMMUNITY**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2011

S tem diplomskim delom želim zaključiti univerzitetni študij mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo je bilo opravljeno na Katedri za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije iz dne 23.10.2009 ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Ines Mandić-Mulec, za somentorico dr. Barbara Kraigher in za recenzenta prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec

Somentorica: dr. Barbara Kraigher

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Ines Mandić-Mulec,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Barbara Kraigher,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Spodaj podpisana se strinjam z objavo diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da sta elektronska in tiskana oblika diplomske naloge enaki.

Petra Zeme

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.25/.26:628.35:615.3(043)=163.6
KG mikrobna ekologija/mikrobne združbe/nitrifikacijske bakterije/amonij-oksidirajoče bakterije/*Nitrospira* sp./biološke čistilne naprave/odpadne vode/aktivno blato/farmakološke učinkovine/diklofenak
AV ZEME, Petra
SA MANDIĆ-MULEC, Ines (mentorica)/KRAIGHER, Barbara (somentorica)/AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN VPLIV FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN NA STRUKTURO NITRIFIKACIJSKE ZDRUŽBE V AKTIVNEM BLATU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 45 str., 4 pregl., 14 sl., 6 pril., 40 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Čistilne naprave iz odpadne vode odstranjujejo kosovne odpadke, pesek, maščobe; v bioreaktorjih pa se s pomočjo mikrobioloških procesov zmanjšuje koncentracija organskih spojin in dušikovih anorganskih molekul. Amonij in nitrit se odstranjujeta s procesom nitrifikacije, kjer sodelujejo amonij – oksidirajoče in nitrit – oksidirajoče bakterije. Metabolizem omenjenih bakterijskih skupin je zelo občutljiv na spremembe v stresnih dejavnikih. V tem diplomskem delu smo preučevali vpliv farmakoloških učinkovin na AOB in skupino *Nitrospira* spp. v aktivnem blatu. V laboratorijskem poskusu smo preučevali vpliv diklofenaka na skupno bakterijsko združbo, AOB in *Nitrospira* spp. Strukturo bakterijske združbe in nitrifikatorjev smo proučevali s T-RFLP analizo skupnih bakterijskih genov za 16S rRNA, za *Nitrospira* spp. značilnih genov za 16S rRNA, pri AOB pa smo analizirali gene *amoA*. Vpliv na *Nitrospira* spp. smo preverili tudi z izdelavo genske knjižnice. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko prikažemo, da izbrana farmakološka sredstva povzročijo spremembe v podskupini II *Nitrospira* sp., na združbo AOB pa ima manjši vpliv diklofenak.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 579.25/.26:628.35:615.3(043)=163.6
CX microbial ecology/microbial communities/nitrifying bacteria/ammonia-oxidizing bacteria/*Nitrospira* sp./biological wastewater treatment plants/wastewater/activate sludge/pharmaceutical residues/ diclofenac
AU ZEME, Petra
AA MANDIČ-MULEC, Ines (supervisor)/KRAIGHER, Barbara (co-advisor)/AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
PP University in Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PB SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PY 2011
TI INFLUENCE OF PHARMACEUTICAL RESIDUES ON THE STRUCTURE OF ACTIVATED SLUDGE NITRIFYING COMMUNITY
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 45 p., 4 tab., 14 fig., 6 ann., 40 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Microbiological processes in wastewater treatment plants reduce concentrations of organic compound and inorganic forms of nitrogen. Nitrification is the process by which ammonia is oxidized to nitrite by ammonia – oxidizing bacteria (AOB) and then nitrite is subsequently oxidized to nitrate by nitrite – oxidizing bacteria (NOB). Nitrifiers are highly sensitive to several environmental and operational factors and the aim of this diploma thesis was to evaluate the influence of commonly used pharmaceuticals on the structure of AOB and *Nitrospira* spp. in the activated sludge. In addition, the influence of diclofenac on the bacterial, AOB and *Nitrospira* spp. community structure was evaluated in a batch system using T-RFLP fingerprinting analysis and gene libraries. Bacterial community and the NOB were analyzed at the level of 16S rRNA gene, while for AOB the *amoA* gene was targeted. Results suggest that the used pharmaceuticals influence the sublineage II *Nitrospira* spp., while diclofenac also affected the composition of the AOB community but had lesser effect on *Nitrospira* spp.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE	2
1.1.1 Namen	2
1.1.2 Hipoteze	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 DELOVANJE ČISTILNIH NAPRAV	3
2.2 NITRIFIKACIJA	5
2.2.1 Amonij oksidirajoče bakterije.....	5
2.2.2 Nitrit oksidirajoče bakterije.....	7
2.2.3 Sodelovanje NOB in AOB	9
2.3 PRISOTNOST FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN V ODPADNI VODI	9
2.3.1 Vpliv farmacevtikov na mikrobno združbo v aktivnem blatu	9
2.3.2 Razgradnje farmakoloških učinkovin v OV.....	10
2.4 RESTRIKCIJSKI POLIMORFIZEM DOLŽIN KONČNIH FRAGMENTOV (T-RFLP).....	11
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 MATERIALI.....	12
3.1.1 Kemikalije	12
3.1.2 Encimi	12
3.1.3 Pufri in raztopine.....	12
3.1.4 Gojišča in umetna odpadna voda	13
3.2 PILOTNA ČISTILNA NAPRAVA (BIOREAKTORJI).....	13
3.3 VZORČENJE AKTIVNEGA BLATA IZ PILOTNIH ČISTILNIH NAPRAV	15
3.4 EKSPERIMENT V ERLLENMAJERICAH: UGOTAVLJANJE VPLIVA DIKLOFENAKA NA BAKTERIJSKO ZDRUŽBO AKTIVNEGA BLATA	15
3.5 VZORCI IZ KOMUNALNIH ČISTILNIH NAPRAV	15
3.6 IZOLACIJA DNA	16
3.7 POMNOŽEVANJE GENOV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR) ...	16

3.7.1	Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNA	16
3.7.2	Pomnoževanje genov za 16S rRNA iz bakterijskega debla <i>Nitrospira</i>	17
3.7.3	Pomnoževanje bakterijskega gena <i>amoA</i> s PCR	18
3.7.4	Čiščenje PCR produktov	18
3.8	IZVEDBA T-RFLP IN ANALIZA PROFILOV	19
3.8.1	Restrikcija PCR produktov	19
3.8.2	Etanolna precipitacija in izvedba T-RFLP	19
3.8.3	Analiza T-RFLP profilov	19
3.9	IZDELAVA GENSKE KNJIŽNICE ZA <i>NITROSPIRA</i>	20
4	REZULTATI	21
4.1	VPLIV FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN NA STRUKTURO NITRIFIKACIJSKE ZDRUŽBE V AKTIVNEM BLATU BIOREAKTORJEV	21
4.1.1	Vpliv farmakoloških učinkovin na strukturo združbe bakterij, ki oksidirajo amonijak (AOB)	21
4.1.2	Vpliv farmakoloških učinkovin na strukturo debla <i>Nitrospira</i> (analiza T-RFLP)	23
4.1.3	Vpliv farmakoloških učinkovin na strukturo debla <i>Nitrospira</i> (pogled v diverzitetu z gensko knjižnico odsekov genov za 16S rRNA)	26
4.2	VPLIV DIKLOFENAKA NA BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V AKTIVNEM BLATU	29
4.2.1	Vpliv diklofenaka na bakterijsko združbo	29
4.2.2	Vpliv diklofenaka na amonij - oksidirajoče bakterije (AOB)	31
4.2.3	Vpliv diklofenaka na predstavnike debla <i>Nitrospira</i>	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	34
5.1	VPLIV FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN NA AOB IN <i>NITROSPIRA</i> SP	34
5.1.1	Vpliv farmakoloških učinkovin na AOB	34
5.1.2	Vpliv farmakoloških učinkovin na skupino <i>Nitrospira</i>	35
5.2	VPLIV DIKLOFENAKA NA CELOTNO BAKTERIJSKO ZDRUŽBO IN ZDRUŽBO NITRIFIKATORJEV	37
5.3	SKLEPI	38
6	POVZETEK	40
7	VIRI	41

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pričakovane dolžine terminalnih fragmentov (TF) in ustrezne skupine AOB pridobljene z analizo T-RFLP gena <i>amoA</i> (Park in Noguera, 2004)	6
Preglednica 2: Fizikalno – kemijske razmere v bioreaktorjih (Kosjek in sod., 2007)	14
Preglednica 3: Izmerjeni parametri na čistilni napravi (ČN) Šmarje pri Jelšah in Rogaška Slatina.....	16
Preglednica 4: Uporabljeni specifični začetni oligonukleotidi.....	18

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematski prikaz čiščenja odpadne vode na čistilni napravi (povzeto po delovanju CASS sistema in po CČN Domžale – Kamnik, 2009).....	4
Slika 2: Splošni prikaz poteka analize T-RFLP gena <i>amoA</i> (Horz in sod., 2000)	6
Slika 3: Filogenetsko drevo debela <i>Nitrospira</i> na podlagi analiz sekvenc 16S rRNA (Wagner in Loy, 2002).....	8
Slika 4: Bioreaktorji (Kosjek in sod., 2007).....	14
Slika 5: Prikaz prevladujočih terminalnih fragmentov (TF) značilnih za AOB v reaktorjih z različnimi koncentracijami farmakoloških učinkovin.....	21
Slika 6: Prikaz relativne zastopanosti terminalnega fragmenta (TF) dolžine 219 bp v reaktorjih	22
Slika 7: Relativna zastopanost posameznih terminalnih fragmentov (TF) značilnih za <i>Nitrospira</i> v reaktorjih z različnimi koncentracijami farmakoloških učinkovin ob treh časih vzorčenja	23
Slika 8: Relativna zastopanost terminalnih fragmentov (TF) dolžin 261bp in 330 bp v reaktorjih.....	24
Slika 9: Relativna zastopanost terminalnih fragmentov (TF) <i>Nitrospira</i> v aktivnem blatu iz komunalnih čistilnih naprav – Rogaška Slatina in Šmarje pri Jelšah.	25
Slika 10: Filogenetska analiza sekvenc genov za 16S rRNA, značilnih za <i>Nitrospira</i> , pridobljenih iz aktivnega blata, bremenjenega s farmakološkimi učinkovinami. Za pomnoževanje gena za 16S rRNA, značilnega za deblo <i>Nitrospira</i> , smo uporabili začetna oligonukleotida 27f in N-spira705r.....	27
Slika 11: Filogenetska analiza sekvenc genov za 16S rRNA, značilnih za <i>Nitrospira</i> , pridobljenih iz aktivnega blata, bremenjenega s farmakološkimi učinkovinami. Za pomnoževanje genov za 16S rRNA, značilnega za deblo <i>Nitrospira</i> , smo uporabili začetna oligonukleotida NSR-1113f in NSR-1264r.....	28
Slika 12: Primerjava profilov T-RFLP bakterijskih združb v aktivnem blatu, inkubiranem pri različnih koncentracijah diklofenaka.	29
Slika 13: Relativna zastopanost prevladujočih terminalnih fragmentov (TF) v združbi AOB pod vplivom inkubacije z/brez diklofenaka	31
Slika 14: Relativna zastopanost prevladujočih terminalnih fragmentov (TF) <i>Nitrospira</i> sp. ob različnih časih inkubacije z oz. brez diklofenaka.....	33

KAZALO PRILOG

Priloga A: Dendrogram AOB združbe iz aktivnega blata, ki je bil izpostavljen različnim koncentracijam farmakoloških učinkovin

Priloga B: Dendrogram za deblo *Nitrospira* iz aktivnega blata, ki je bil izpostavljen različnim koncentracijam farmakoloških učinkovin

Priloga C: Dendrogram AOB združbe, ki je bila izpostavljena različnim koncentracijam diklofenaka

Priloga D: Prikaz relativne zastopanosti prevladujočih terminalnih fragmentov združbe AOB ob različnih časih inkubacije z/brez diklofenaka.

Priloga E: Dendrogram debla *Nitrospira* iz aktivnega blata bremenjenega z različnimi koncentracijami diklofenaka

Priloga F: Vpliva diklofenaka na podskupino I in II *Nitrospira*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AOB	bakterije, ki oksidirajo amonijak
ČN	čistilna naprava
NH ₃	kemijska oznaka za molekulo amonijaka
NH ₄ ⁺	kemijska oznaka za ionizirajočo obliko molekule amonijaka (amonij)
NO ₂ ⁻	kemijska oznaka za molekulo nitrita
NO ₃ ⁻	kemijska oznaka za molekulo nitrata
NOB	bakterije, ki oksidirajo nitrit
OV	odpadna voda
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
TF	terminalni fragment
T-RFLP	restriksijski polimorfizem dolžin končnih fragmentov (ang. Terminal restriction fragment length polymorphism)

1 UVOD

Naraščajoča uporaba farmakoloških učinkovin v medicini, veterini in farmacevtski industriji viša njihove koncentracije v okolju. Zaradi njihove biološke aktivnosti in akumulacije v površinskih, podzemskih in potencialno tudi pitnih vodah lahko negativno vplivajo na okolje in živa bitja.

Čedalje vidnejšo vlogo pri čiščenju vod imajo čistilne naprave, ki iz odpadne vode odstranjujejo organske in anorganske spojine. Proces v čistilnih napravah bi tako lahko zmanjšali prisotnost ksenobiotikov, med katere uvrščamo tudi farmakološka sredstva, saj so pokazali, da se koncentracija izbranih zdravil ob prisotnosti aktivnega blata zmanjša (Kosjek in sod., 2007). Kraigher in sodelavci (2008) so prikazali vpliv izbranih farmakoloških spojin tudi na strukturo bakterijske združbe v aktivnem blatu.

Zelo pomembno vlogo v čistilnih napravah ima nitrifikacija, s pomočjo katere se iz odpadne vode odstranita amonij in nitrit. Nitrifikatorji pa so občutljivi na kar nekaj dejavnikov, med katerimi so tudi nizka temperatura, odstopanja pH vrednosti iz optimalnega območja za nitrifikacijsko združbo, nizka koncentracija kisika in številne kemične spojine (Prosser, 1989; Siripong in Rittmann, 2007).

V tem diplomskem delu smo se osredotočili na spremembe v nitrifikacijski združbi iz aktivnega blata, ki je bil pred analizo izpostavljen vplivu izbranih farmacevtikov.

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

1.1.1 Namen

Namen naloge je bil ugotoviti kakšen je vpliv izbranih farmakoloških učinkovin in njihovih koncentracij na amonij oksidirajoče bakterije in predstavnike iz rodu *Nitrospira*, ki oksidirajo nitrit. Preverili smo tudi vpliv diklofenaka na bakterijsko združbo, na amonij oksidirajoče bakterije in skupino *Nitrospira* sp.

1.1.2 Hipoteze

Predpostavili smo, da zdravila vplivajo na nitrifikacijsko združbo v aktivnem blatu, kar naj bi se odražalo v strukturi amonij oksidirajočih bakterij in spremembi v zastopanosti predstavnikov debla *Nitrospira*, ki spadajo med nitrit oksidirajoče bakterije in sicer:

- Farmaceutiki vplivajo na sestavo AOB in nitrit oksidirajočih bakterij (NOB - *Nitrospira* sp.).
- Diklofenak vpliva na sestavo mikrobne združbe (celotna bakterijska združba, AOB in NOB - *Nitrospira* sp.).

2 PREGLED OBJAV

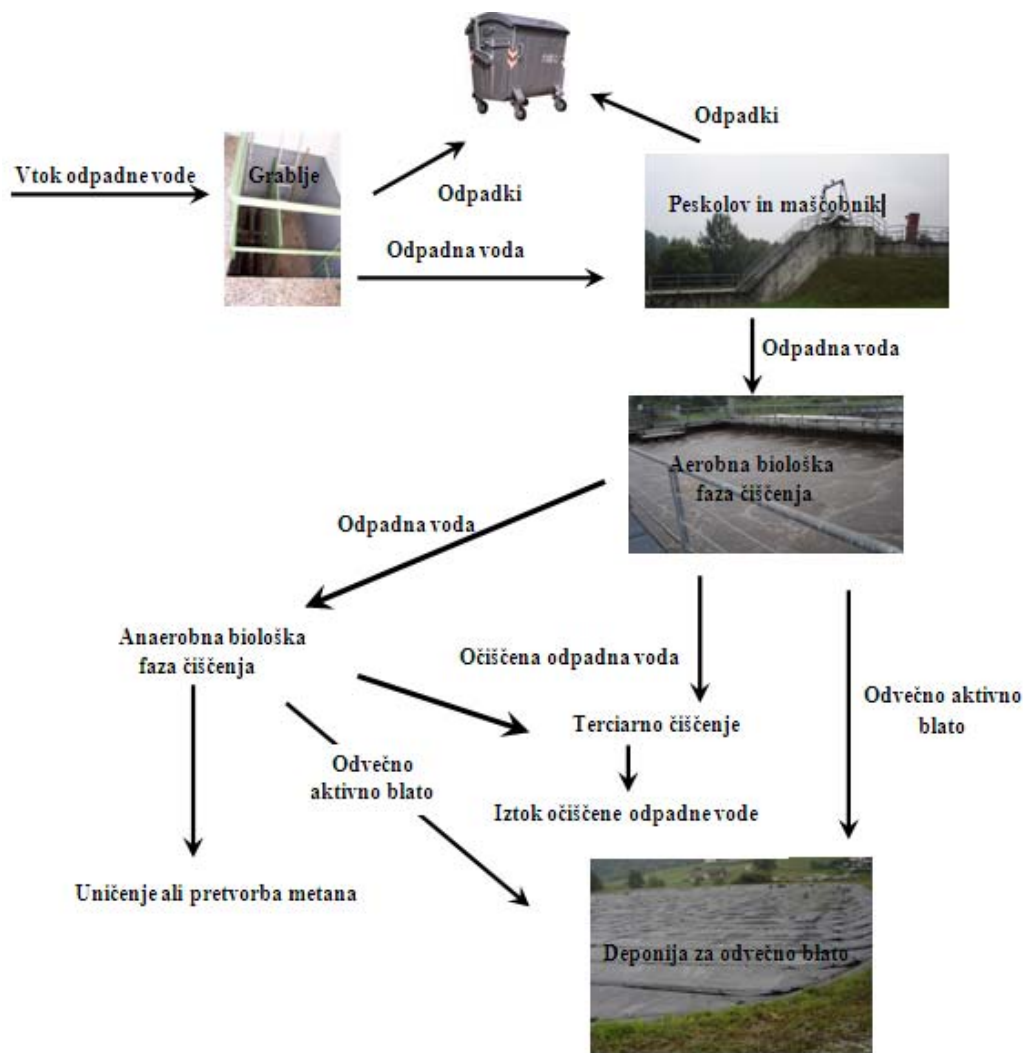
2.1 DELOVANJE ČISTILNIH NAPRAV

Čistilne naprave so namenjene za čiščenje odpadne vode, ki je sestavljena iz različnih deležev komunalnih in industrijskih odplak. Tako na čistilne naprave pritekajo organske snovi, anorganske spojine in tudi pesticidi, snovi iz petrokemičnih procesov, odplake iz kovinske industrije in farmakološke učinkovine. Obdelava odpadne vode je razdeljena na primarno, sekundarno in ponekod tudi terciarno čiščenje. Končni cilj je zmanjšanje obremenitve in kemične kontaminacije odpadne vode (CČN Domžale - Kamnik, 2009).

V primarni ali mehanski fazi čiščenja iz odpadne vode očistimo večje organskih in anorganskih delce (Madigan in Martinko, 2006). Najprej se na grabljah izločijo delci večji od 15mm, ki se odvedejo do mobilnega zaboja, katerega vsebina se odpelje na komunalno odlagališče odpadkov. Voda preko grabelj teče v peskolov, kjer se pesek in preostali težji delci ločijo od odpadne vode in prečrpajo v zabojnik. Odpadna voda nato doteka v maščobnik, kjer s strgali odstranimo olja in maščobe ter jih zberemo v zabojniku za odpadke (CČN Domžale - Kamnik, 2009).

Sekundarna ali biološka stopnja čiščenja je razdeljena na aerobno in anaerobno fazo. Odpadna voda po mehanskem čiščenju priteče v aeracijski bazen, kjer je ob stalnem prezračevanju visoka koncentracija mikroorganizmov (aktivno blato), ki odpadno vodo uporabljajo za rast in razmnoževanje. Kot vir hrane mikroorganizmi najprej porabijo lahko razgradljive organske snovi. Ko pade obremenjenost vode z organskimi spojinami začne potekati odstranjevanje dušikovih anorganskih spojin s procesom nitrifikacije (CČN Domžale – Kamnik, 2009). V anaerobni sekundarni stopnji čiščenja prihaja do razgradnje težje razgradljivih organskih snovi (npr. celuloza) s polisaharidazami, proteazami in lipazami. Nastale komponente anaerobni mikroorganizmi fermentirajo do metana in ogljikovega dioksida. Metan se lahko uniči z gorenjem ali pretvori v toploto in električno energijo (Madigan in Martinko, 2006).

Terciarno čiščenje zmanjša koncentracije fosfatov, nitrita in nitrata iz odpadne vode, ki nato odteka iz čistilne naprave, s pomočjo filtracije, precipitacije ali kloriranja. V večini primerov se uporablja kloriranje, saj se s tem zniža tudi stopnja biološke kontaminacije. Za dezinfekcijo odpadne vode se uporabljata tudi ultravijolična radiacija (UV) in močan oksidant kot je ozon (Madigan in Martinko, 2006).



Slika 1: Shematski prikaz čiščenja odpadne vode na čistilni napravi (povzeto po delovanju CASS sistema in po CCN Domžale - Kamnik, 2009)

2.2 NITRIFIKACIJA

Nitrifikacija je mikrobiološki proces, kjer poteče oksidacija amonijaka (NH_3) preko nitrita (NO_2^-) do nitrata (NO_3^-) (Bock in sod., 1992). V prvem koraku nitrifikacije amonij monooksigenaze oksidira NH_3 do hidroksilamina (NH_2OH) (McTavish in sod., 1993), kateri se v drugem koraku ob delovanju hidroksilamin oksidoreduktaze oksidira v NO_2^- (Sayavedra-Soto in sod., 1994). Prvi del nitrifikacije vršijo amonij oksidirajoče bakterije (AOB) uvrščene v razred *Proteobacteria* (McTavish in sod., 1993). Drugi del nitrifikacije, kjer se NO_2^- s pomočjo nitritne oksidoreduktaze oksidira v NO_3^- , vršijo nitrit oksidirajoče bakterije (NOB) (Kirsten in Bock, 1993). Biološka oksidacija NH_3 je tako ključni proces, ki zmanjšuje toksičnost, visoko potrebo po kisiku in možnost za tvorbo evtrofičnega vodnega okolja (Arthur in sod., 1987). Število in fiziološka aktivnost nitrifikacijskih bakterij v bioreaktorjih za čiščenje odpadne vode (OV) pa je omejeno z limitirajočimi dejavniki kot so temperatura, koncentracija raztopljenega kisika, pH, starost aktivnega blata v procesu čiščenja OV, koncentracija substratov in prisotnost toksičnih spojin. Omenjeni dejavniki močno vplivajo na nitrifikacijsko združbo in zaradi njihove občutljivost ter počasne rasti je potrebno kar nekaj časa, da proces nitrifikacije po stresni situaciji ponovno poteka nemoteno (Okabe in sod., 1999).

2.2.1 Amonij oksidirajoče bakterije

Aerobna oksidacija NH_3 , ki jo vršijo AOB, se v čistilni napravi (ČN) pogosto povezuje z drugimi procesi, ki so del kroženja dušika (oksidacija nitrita, denitrifikacija), kar omogoči zmanjšanje koncentracije dušikovih spojin v OV (Hiorns in sod., 1995). Raziskave združbe AOB so bile sprva osredotočene na amonij-oksidirajočo skupino *Nitrosomonas europaea/eutropha*, saj za le – te poznamo gojitvene metode. Molekularne metode pa so omogočile vpogled v pestrost in sestavo celotne združbe AOB (Rowan in sod., 2003).

Na podlagi analize T-RFLP (restrikcijski polimorfizem dolžin končnih fragmentov) dela gena *amoA* (zapis za aktivno mesto encima amonij monooksigenaze) z dolžino 491 bp, v

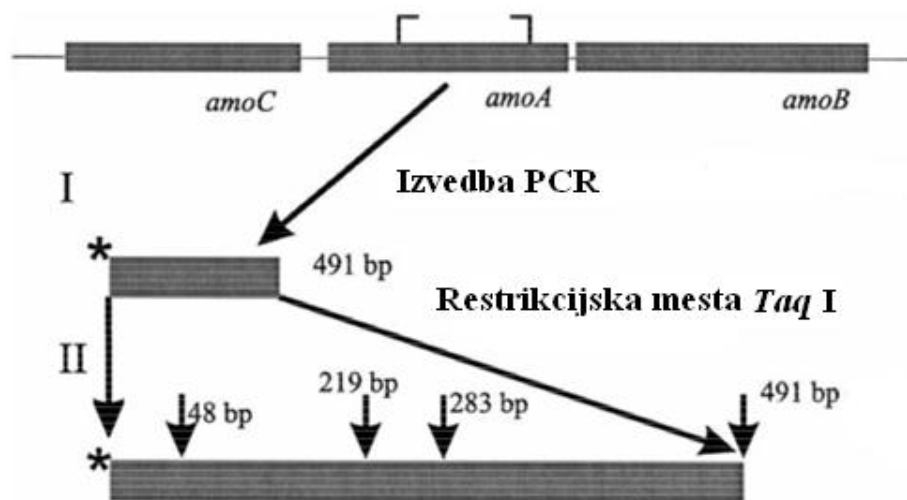
kateri so kot restrikcijski encim uporabili *TaqI*, so združbo AOB razdelili v šest skupin, kot kaže spodnja preglednica (Park in Noguera, 2004).

Preglednica 1: Pričakovane dolžine terminalnih fragmentov (TF) in ustrezne skupine AOB pridobljene z analizo T-RFLP gena *amoA*

Nitrifikacijska skupina	Dolžina TF (bp)
Skupina 1: <i>Nitrosomonas europaea/eutropha</i>	219/270*, 491/491**
Skupina 2: <i>Nitrosomonas oligotropha</i>	48/135, 354/135, 419/219
Skupina 3: <i>Nitrosomonas cryotolerans</i>	48/441, 354/48, 441/48, 491/491
Skupina 4: <i>Nitrosomonas marina</i>	48/441, 48/135, 491/491
Skupina 5: <i>Nitrosomonas communis</i>	491/491
Skupina 6: <i>Nitrosospira sp.</i>	283/206

* dolžina TF s fluorescentno označenim vodilnim začetnim oligonukleotidom (ang. forward primer)/dolžina TF s fluorescentno označenim povratnim začetnim oligonukleotidom (ang. reverse primer)

** dolžini TF sta enaki, če ni prisotnega restrikcijskega mesta



Slika 2: Splošni prikaz poteka analize T-RFLP gena *amoA* (povzeto po Horz in sod., 2000)

Na sestavo združbe AOB vpliva sestava OV, intenziteta aeracije (vpihanje kisika v bioreaktor), zadrževalni čas aktivnega blata in OV v bioreaktorjih ter kemijska potreba po kisiku (KPK) (Stenstrom in Song, 1991). Mobbary in sod. (1996) so prikazali prevladujočo vlogo predstavnikov skupine *Nitrosomonas* v aktivnem blatu in biofilmih ČN, medtem ko so Dionisi in sodelavci (2002) navedli podatek o prevladi vrste *Nitrosomonas oligotropha*. V aktivnem blatu, izpostavljenem višjim koncentracijam NH_3 , je dominantna vrsta *Nitrosococcus mobilis*, ki jo filogenetsko uvrščamo v rod *Nitrosomonas* (Wagner in sod., 1998). Okolje z nižjimi koncentracijami NH_3 pa je ugodnejše za predstavnike rodu *Nitrospira* (Hiorns in sod., 1995). Whang s sodelavci (2009) je na podlagi analize T-RFLP prikazal, da v komunalni ČN prevladuje skupina *Nitrosomonas marina*, medtem ko so bile skupine *N. europea/eutropha*, *Nitrospira* in *Nitrosomonas* prisotne le občasno. V aktivnem blatu ČN tako lahko prevladuje ena skupina ali sobiva več različnih vrst AOB (Rowan in sod., 2003). Daims in sodelavci (2001) pa so navedli podatek, da je za učinkovito čiščenje in stabilnost mikrobne združbe zelo pomembna čim večja pestrost združba AOB.

2.2.2 Nitrit oksidirajoče bakterije

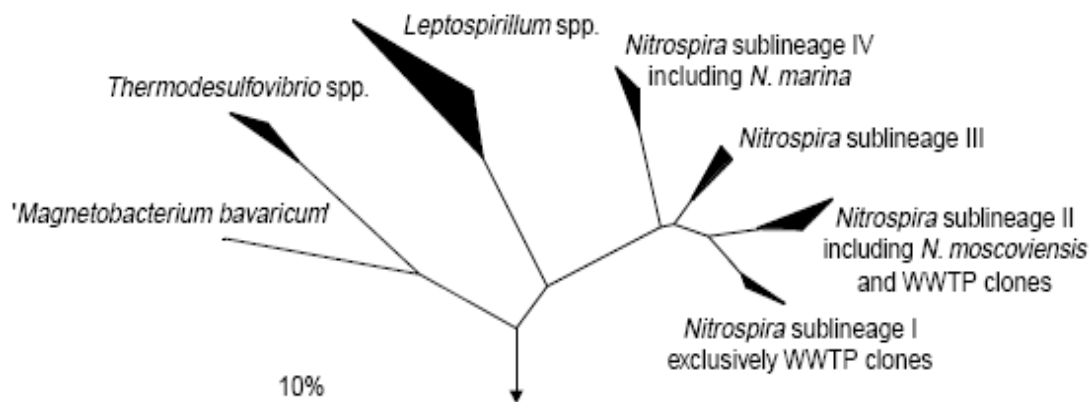
V primerjavi s sekvencami genov za 16S rRNA AOB, ki se uvrščajo v monofiletsko skupino, se NOB na podlagi filogenetskih analiz sekvenc genov za 16S rRNA, uvrstijo v štiri rodove (Teske in sod., 1994). Najbolj je preučen rod *Nitrobacter*, ki se uvršča v razred *Alphaproteobacteria* (Bock in sod., 1990). Rod *Nitrospira* je prvotno spadal v deblo *Proteobacteria*, a so ga na podlagi analize gena za 16S rRNA uvrstili v samostojno deblo (Teske in sod., 1990). Druga predstavnika NOB, značilna za morsko okolje, sta *Nitrospina gracilis* (*Deltaproteobacteria*) in *Nitrococcus mobilis* (*Gammaproteobacteria*) (Watson in sod., 1971).

Analize so pokazale, da je pestrost združbe NOB v aktivnem blatu ČN odvisna od koncentracije nitrita, parcialnega tlaka kisika ter dostopnosti preprostih organskih substratov (Daims in sod., 2001). Novejše raziskave, ki temeljijo na analizi sekvenc 16S

rRNA in fluorescentni *in situ* hibridizaciji (FISH), so pokazale, da je dominantna skupina med NOB *Nitrospira*, nakazujejo pa tudi na prilagojenost predstavnikov rodu *Nitrobacter* na višje koncentracije nitrita in kisika (Dionisi in sod., 2002). Z analiziranjem sekvenc 16S rRNA značilnih za *Nitrospira* iz različnih ČN je Dionisi s sodelavci (2002) prikazal, da tip odpadne vode ne vpliva na skupino *Nitrospira*. V bioreaktorjih, kjer nitrifikacija skoraj ne poteka, predstavnikov skupine *Nitrospira* niso uspeli odkriti (Burrell in sod., 1998).

Filogenetska analiza genov za 16S rRNA značilnih za predstavnike *Nitrospira* je prikazala sobivanje podskupine I *Nitrospira* in podskupine II *Nitrospira* v biofilmu in aktivnem blatu ČN. Največ raziskav je opravljenih pri »*Candidatus Nitrospira defluvii*«, ki spada v podskupino I (Maixner in sod., 2006).

Pri preučevanju *Nitrospira* z analizo T-RFLP in uporabljenimi specifičnimi začetnimi oligonukleotidi ter restrikcijskim encimom *Hae*III se pojavita dva dominantna terminalna fragmenta (TF). Z analizo klonov, značilnih za posamezno podskupino, so pokazali, da je dolžina 261 bp značilna za podskupino I, 330 bp pa je dolžina, ki je značilna za podskupino II (Kraigher in sod., članek v pripravi).



Slika 3: Filogenetsko drevo debla *Nitrospira* na podlagi analiz sekvenc 16S rRNA (povzeto po Wagner in Loy, 2002)

2.2.3 Sodelovanje NOB in AOB

V procesu nitritacije nastaja NO_2^- , ki je lahko toksičen za AOB. Nitrit oksidirajo bakterije iz debla *Nitrospira*, ki se z AOB povežejo v mutualističen odnos. Maixner in sodelavci (2006) so pokazali, da so v neposredni bližini AOB predstavniki debla *Nitrospira* iz podskupine I. Predstavniki iz podskupine II so prostorsko za podskupino I in so oddaljeni od AOB. Podskupina I ima morda prednost pred podskupino II, saj je manj občutljiva na višje koncentracija NO_2^- . Na razmerje med podskupinama lahko vplivajo še afiniteta za kisik, paša protozojev, prisotnost specifičnih fagov in dostopnost organskih substratov (nekateri predstavniki debla *Nitrospira* so miksotrofi) (Maixner in sod., 2006).

2.3 PRISOTNOST FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN V ODPADNI VODI

Visoke koncentracije farmakoloških učinkovin v iztokih iz farmakoloških obratov in v komunalnih odplakah dosežejo ČN (La Farre in sod, 2001; Kosjek in sod., 2007). Aktivno blato je tako obremenjeno s kompleksno mešanico organskih in anorganskih spojin. Polarne spojine, med katere uvrščamo tudi farmakološke učinkovine, lahko zaradi dobre topnosti v vodi in slabe razgradljivosti preidejo stopnje čiščenja in tako ponovno postanejo potencialno nevarne za zdravje (Petrović in sod., 2003). Zaradi velike uporabe, morebitnega toksičnega vpliva in njihove prisotnosti v vodnih ekosistemih in bioreaktorjih ČN so nekaterim farmakološkim učinkovinam preverili možnost razgradnje v bioreaktorjih (Zwiener in Frimmel, 2003; Kosjek in sod., 2007) in vpliv na mikrobnou združbo v aktivnem blatu (Kraigher in sod., 2008).

2.3.1 Vpliv farmacevtikov na mikrobnou združbo v aktivnem blatu

Za boljši vpogled in morebitno izboljšanje tehnologije odstranjevanja farmakoloških učinkovin iz OV so Kosjek in sod. (2007) v pilotni ČN (bioreaktorji) preverjali razgradljivost farmakoloških učinkovin. Bioreaktorje so bremenili z različnimi koncentracijami farmacevtikov (ibuprofen, ketoprofen, diklofenak, naproksen in klofibrina kislina) in pokazali stopnjo razgradnje izbranih farmakoloških učinkovin. Koncentracija iboprofena, naproksena in ketoprofena se je zmanjšala za $\geq 87\%$, koncentracija diklofenaka pa se je zmanjšala za 49 – 59 %. Po enomesečnem delovanju

bioreaktorjev se je koncentracija klofibrične kisline zmanjšala za 30 %, vendar niso opazili adaptacije biomase.

Kraigher in sodelavci (2008) so preučevali vpliv zgoraj naštetih farmacevtikov na sestavo bakterijske združbe. Manjše razlike v strukturi bakterijske združbe so zaznali pri koncentraciji $50 \mu\text{gL}^{-1}$ farmakoloških učinkovin v OV. Pri višjih koncentracijah v bioreaktorju (200 in $500 \mu\text{gL}^{-1}$) so se razlike v primerjavi s koncentracijo $50 \mu\text{gL}^{-1}$ še povečale. Pripravili so tudi dve knjižnici bakterijskih genov 16S rRNA iz bakterijske združbe aktivnega blata, ki ni bila izpostavljena vplivu farmakoloških učinkovin, in iz bakterijske združbe, ki je rastla in se obnavljala pri dodanih farmakoloških sredstvih v koncentraciji $50 \mu\text{gL}^{-1}$. V obeh knjižnicah so bili dominantni predstavniki iz razreda *Betaproteobacteria*, katerih velik delež je predstavljal rod *Acidovorax*. Druga najpomembnejša skupina, ki prav tako spada med betaproteobakterije, je denitrifikacijski rod *Thauera*, za katerega predvidevajo, da lahko razgrajujejo fenol. Najopaznejše razlike me knjižnicama so zaznali pri deblu *Nitrospira*. V reaktorju brez farmakoloških učinkovin je debla *Nitrospira* predstavljalo 8 % celotne bakterijske združbe, medtem ko v bioreaktorju s farmakološkimi učinkovinami v koncentraciji $50 \mu\text{gL}^{-1}$ predstavnikov debla *Nitrospira* niso našli (Kraigher in sod., 2008).

2.3.2 Razgradnje farmakoloških učinkovin v OV

Raziskovalci so odkrili različne koncentracije ibuprofena v OV, ki je dotekala v ČN. Izmerjene koncentracije so dosegle vrednosti do $168 \mu\text{gL}^{-1}$ (Gómez in sod., 2007). V pilotni ČN se je koncentracija ibuprofena zmanjšala 40 do 43 %, medtem ko se je v bioreaktorjih z biofilmom reducirala 30 do 36 % (Zwiener in sod., 2003). Razgradnja ketoprofena in naproksena v pilotni ČN je preseгла 87 % (Kosjek in sod., 2007). Razgradnja diklofenaka je bila 49 do 59 %, medtem ko se koncentracija diklofenaka v ČN z biofilmom ni zmanjšala (Kosjek in sod., 2007; Zwiener in sod., 2003). Veliki standardni odkloni povprečnih vrednosti razgradenj omenjenih farmakoloških sredstev pa nakazujejo na neenakomerno odstranjevanje le – teh iz OV. Razlog za razlike je lahko kemična sestava, saj diklofenak za razliko od drugih zdravilnih sredstev vsebuje dva klorova atoma in NH vez v hidrokarbonatni strukturi (Kosjek in sod., 2007).

2.4 RESTRIKCIJSKI POLIMORFIZEM DOLŽIN KONČNIH FRAGMENTOV (T-RFLP)

Metoda T-RFLP se uporablja za tipizacijo strukture mikrobne združbe. Pomnoževanje izbranega gena poteka s PCR, pri čemer je eden od začetnih oligonukleotidov fluorescentno označen. PCR produkt z restrikcijskim encimom razrežemo na fragmente, ki jih ločimo s kapilarno gelsko elektroforezo. Pridobimo podatke o višini, površini in dolžini vrha v kromatogramu, ki je značilen za določen terminalni fragment (intenziteta fluorescence), ki so izpisani v grafični in tabelirani obliki (Tiedje in sod., 1999).

Na rezultate analize T-RFLP lahko vpliva kvaliteta izolirane DNA (Kirk in sod., 2004, Wu in sod., 2004), uporabljene *Taq* polimeraze (Wu in sod., 2004), uporabljeni začetni oligonukleotidi (Kirk in sod., 2004) in število ciklov PCR (Wu in sod., 2004).

Pridobljeni profili analize T-RFLP okoljskih vzorcev so običajno kompleksni in njihova analiza ter primerjava sta zahtevni. Blackwood s sodelavci (2003) je prikazal, da so analize profilov kvalitetnejše, če iz analize izločimo terminalne fragmente, katerih intenziteta fluorescence je nizka oziroma če zavzamejo manjšo vrednost od 1 % v celotnem profilu. Pri grupiranju vzorcev po podobnosti z uporabo UPGMA metodo (metoda neponderirane aritmetične sredine) dobimo kvalitetnejše rezultate kot z Wardovo metodo (Blackwood in sod., 2003). Za statistično obdelavo in prikaz podatkov uporabljajo različne metode (npr. PCA – metoda glavnih komponent (ang. Principal Component Analysis), CA - korespondenčna analiza (ang. correspondence analysis),...), ki jih izberemo glede na lastnosti vzorca (Culman in sod., 2008).

Analiza T-RFLP se je izkazala kot zanesljiva metoda za analiziranje združbe tal (Blackwood in sod., 2003) in vodnih okolij (Wu in sod., 2004), ter opazovanje kompleksnosti mikrobne združbe v aktivnem blatu čistilnih naprav (Horz in sod., 1999; Rowan in sod., 2003; Siripong in Rittmann, 2007; Kraigher in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

<u>Biolife:</u>	kvasni ekstrakt, pepton, tripton, agar
<u>Merck:</u>	ledocetna kislina, tris – base, 96% etanol, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NH_4Cl , K_2HPO_4 , MgCO_3 , $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl , CaCO_3 , NaCH_3COOH , formamid
<u>Kemika:</u>	K_2HPO_4
<u>Fluka:</u>	kazein pepton, mesni ekstrakt,
<u>Sigma:</u>	agaroz, EDTA, etidijev bromid, X – gal, N,N' – dimetil – formamid, IPTG, ampicilin
<u>Fermentas:</u>	GeneRuler™ 6x Loading Dye Solution, GeneRuler™ DNA Ladder Mix
<u>Promega:</u>	BSA, MgCl_2

3.1.2 Encimi

MBI Fermentas	<i>MspI</i> , <i>HaeIII</i>
Promega	<i>Taq</i> DNK polimeraza

3.1.3 Pufri in raztopine

Pufer 50x TAE (Tris – acetatni pufer)

Tris - base	242 g
Ledocetna kislina	57,1 ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	100 ml
H_2O	do 1000 ml

Raztopina etidijevega bromida

Etidijev bromid (10 mg L^{-1})	50 μl
H_2O	do 1000 ml

3.1.4 Gojišča in umetna odpadna voda

Gojišče PKE

pepton	6 g
kvasni ekstrakt	3 g
H ₂ O	do 1000 ml

Umetna odpadna voda

kvasni ekstrakt	0,13 g
kazein pepton	0,13 g
mesni ekstrakt	0,13 g
CH ₃ COONH ₄	0,317 g
NH ₄ Cl	0,04 g
K ₂ HPO ₄	0,024 g
KH ₂ PO ₄	0,008 g
CaCO ₃	0,1 g
MgCO ₃	0,1 g
NaCl	0,04g
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,005 g
H ₂ O	do 1000 ml

Gojišče LB (Luria – Bertani)

tripton	10 g
kvasni ekstrakt	5 g
NaCl	5 g
agar	6 g
H ₂ O	do 1000 ml

3.2 PILOTNA ČISTILNA NAPRAVA (BIOREAKTORJI)

Bioreaktorji volumna 4,0 L so bili napolnjeni z umetno odpadno vodo (OV), inokulum pa je bilo aktivno blato iz komunalne ČN. Zadrževalni čas OV je bil 48 ur, medtem ko je bil zadrževalni čas aktivnega blata več kot 100 dni, če izključimo obdobje prilagajanja biomase. Za opazovanje adaptacije biomase na farmacevtike (ibuprofen, ketoprofen, diklofenak, naproksen in klofibrična kislina) v koncentraciji 5 µgL⁻¹ in 50 µgL⁻¹ sta bila vzpostavljena dva bioreaktorja (R5 in R50). Tretji bioreaktor (R0) je bil kontrolni, saj umetni OV in biomasi niso dodali farmakoloških učinkovin. Bioreaktorji so neprekinjeno delovali dve leti, razmere se v tem času niso spreminjale, kar je omogočilo prilagoditev

biomase na fizikalno – kemijske razmere, ki so prikazani v Preglednici 2 Po dveh letih je del aktivnega blata iz reaktorja R50 služil kot inokulum za reaktorje R50P, R200 in R500, v katere so dodali farmacevtike v koncentracijah 50, 200 in 500 μgL^{-1} (Kosjek in sod., 2007; Kraigher in sod., 2008).



Slika 4: Bioreaktorji (Kosjek in sod., 2007)

Preglednica 2: Fizikalno – kemijske razmere v bioreaktorjih (Kosjek in sod., 2007)

Fizikalno – kemijski dejavnik	Vrednost
Temperatura	22 °C (± 5 %)
pH na vtoku	7,7 (± 2 %)
pH na iztoku	7,3 (± 5 %)
Koncentracija kisika	7,9 mg L^{-1} (± 5 %)
Neraztopljene snovi	6 g L^{-1} (± 20 %)
Razmerje hrana/biomasa (F/M)	0,03 (± 20 %)

3.3 VZORČENJE AKTIVNEGA BLATA IZ PILOTNIH ČISTILNIH NAPRAV

Aktivno blato je bilo izpostavljeno različnim koncentracijam farmakoloških učinkovin za obdobje dveh let (Kosjek in sod., 2007), kar je opisano v poglavju 3.2. Vzorci so bili shranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 EKSPERIMENT V ERLLENMAJERICAH: UGOTAVLJANJE VPLIVA DIKLOFENAKA NA BAKTERIJSKO ZDRUŽBO AKTIVNEGA BLATA

Aktivnemu blatu, odvzetemu iz R200, sta bila v erlenmajericah dodana umetna OV in diklofenak v koncentracijah 0, 200 in $1000\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$. V erlenmajerici, kjer je bila začetna koncentracija diklofenaka $1000\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$, so koncentracijo počasi višali in v desetih dneh dosegli končno vrednost $5000\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$. Po dvajsetih dneh od začetka inkubacije so umetno OV zamenjali v vseh erlenmajericah z umetno OV, kateri niso bile dodane spojine, ki vsebujejo organski ogljik. Inkubacija aktivnega blata v erlenmajericah je potekala na stresalniku še dodatnih 21 dni, komulativno 41 dni, pri $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorci, odvzeti med inkubacijo, so bili shranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kraigher in sod., neobjavljeni rezultati).

3.5 VZORCI IZ KOMUNALNIH ČISTILNIH NAPRAV

Vzorčenje aktivnega blata je potekalo na komunalni ČN Šmarje pri Jelšah in komunalni ČN Rogaška Slatina. Vzorci so bili odvzeti v fazi aeracije s čimer se doseže homogena razporeditev aktivnega blata. Vzorci so bili preneseni v laboratorij, razdeljeni v sterilne mikrocentrifugirke in shranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorci iz ČN Šmarje pri Jelšah so označeni s S1, kjer številka ponazarja ponovitev. Na ČN Rogaška Slatina smo vzorčili v bazenu 3, zato imajo oznako B3 in zaporedno številko.

Ob vzorčenju smo s prenosnim merilnikom izmerili pH vrednost (pH meter 340i; WTW, Weilheim, Nemčija) in koncentracijo kisika (Oxi meter 315i; WTW, Weilheim, Nemčija) v OV. Koncentracije anorganskih dušikovih spojin smo izmerili s kolorimetričnimi testi (A6/25, N2/25, N5/25) (WTW, Weilheim, Nemčija) na fotometru PhotoLab S6 (WTW,

Weilheim, Nemčija). V Preglednici 3 so podane vrednosti, izmerjene v OV, ki je iztekala iz ČN.

Preglednica 3: Izmerjeni parametri na čistilni napravi (ČN) Šmarje pri Jelšah in Rogaška Slatina

ČN / Izmerjeni parameter	NH_4^+ (mgL^{-1})	NO_2^- (mgL^{-1})	NO_3^- (mgL^{-1})	pH	O_2 (mgL^{-1})
Šmarje pri Jelšah (S)	0,05	0,141	3,2	7,7	5
Rogaška Slatina (B3)	0,27	0,056	0,9	7,5	7,9

3.6 IZOLACIJA DNA

Vzorci aktivnega blata smo iz $-80\text{ }^\circ\text{C}$ prenesli na $4\text{ }^\circ\text{C}$, čez čas pa na sobno temperaturo in se tako izognili poškodbam, ki jih lahko povzroči prehitro taljenje. Po centrifugiranju na 8000 g smo vzorcem odstranili supernatant tako, da je v mikrocentrifugirki ostalo $200\text{ }\mu\text{L}$ vzorca. Za izolacijo DNA iz aktivnega blata smo uporabili PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Solana Beach, CA, ZDA). Izolacija je potekala po navodilih proizvajalca.

Količino in kvaliteto DNA smo preverili z 1% agarozno gelsko elektroforezo, barvanjem v etidijevem bromidu in pregledom pod UV svetlobo.

3.7 POMNOŽEVANJE GENOV Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

3.7.1 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNA

Gen za 16S rRNA smo pomnožili z začetnim oligonukleotidom 27f, ki je na $5'$ koncu označen s 6 – FAM (6 – karboksifluorescein) in z začetnim oligonukleotidom 927r. $25\text{ }\mu\text{L}$ reakcijska PCR mešanica je vsebovala $1\times$ reakcijski pufer, 2 mM Mg_2Cl , $0,2\text{ mg mL}^{-1}$ govejega serumskega albumina (BSA), $200\text{ }\mu\text{M}$ mešanice dNTP, $0,2\text{ }\mu\text{M}$ obeh začetnih oligonukleotidov, 1 enoto *Taq* DNA polimeraze (Promega, Madison, WI, ZDA) in $1\text{ }\mu\text{L}$ raztopine DNA.

Uporabili smo program: 5 min pri 94 °C; temu sledi 30 ciklov: 1 min pri 94 °C, 1 min pri 53 °C in 90 s pri 72 °C; temu je sledil še cikel 7 min pri 72 °C.

Količino in kvaliteto DNA smo preverili z 1 % agarozno gelsko elektroforezo, barvanjem v etidijevem bromidu in pregledom pod UV svetlobo.

3.7.2 Pomnoževanje genov za 16S rRNA iz bakterijskega debla *Nitrospira*

Za pomnoževanje genov iz bakterijskega debla *Nitrospira*, ki smo jih nato analizirali s T-RFLP, smo uporabili specifična začetna oligonukleotida 27f, ki je bil označen na 5' koncu s 6-FAM in Nspira-705r (Freitag in sod., 2005). PCR produkte smo uporabili tudi za izdelavo genske knjižnice, vendar smo pri tem uporabili prej omenjene neoznačene začetne oligonukleotide.

25 µL reakcijska PCR mešanica je vsebovala 1x reakcijski pufer, 2 mM Mg₂Cl, 0,3 mg mL⁻¹ BSA, 200 µM mešanice dNTP, 0,2 µM obeh začetnih oligonukleotidov, 1 enoto *Taq* DNA polimeraze in 2 µL raztopine DNA.

Uporabili smo program: 5 min pri 95 °C; temu sledi 35 ciklov: 1 min pri 94 °C, 1 min pri 59 °C in 1 min pri 72 °C; temu je sledil še cikel 7 min pri 72 °C za.

PCR pomnožke, ki smo jih pridobili z uporabo začetna oligonukleotida NSR-1113f in NSR-1264r (Dionisi in sod., 2002), smo uporabili za izdelavo genske knjižnice. 25 µL PCR reakcijska mešanica je vsebovala enake količine potrebnih raztopin, kot je navedeno za pomnoževanje gena za 16S rRNA.

Uporabili smo program, ki ga navaja Dionisi s sodelavci (2002), le da smo število ciklov zmanjšali na 35 in skrajšali čas zadnjega koraka na 10 min.

Količino in kvaliteto DNA smo preverili z 1 % agarozno gelsko elektroforezo, barvanjem v etidijevem bromidu in pregledom pod UV svetlobo.

3.7.3 Pomnoževanje bakterijskega gena *amoA* s PCR

Gen *amoA* smo pomnožili s specifičnimi začetimi oligonukletidi *amoA*-1f, ki je na 5' koncu označen s 6-FAM in *amoA*-2r (Siripong in Rittmann, 2007).

50 μ L reakcijska PCR mešanica je vsebovala 1x reakcijski pufer, 5 mM Mg_2Cl , 1% formamid, 0,2 mg mL^{-1} BSA, 400 μ M mešanice dNTP, 500nM obeh začetnih oligonukleotidov, 1 enoto *Taq* DNA polimeraze in 2 μ L raztopine DNA.

Uporabili smo program: 5 min pri 94 °C; temu sledi 35 ciklov: 45s pri 94 °C , 1 min pri 55 °C in 1 min pri 72 °C; temu je sledil še cikel 7 min pri 72 °C.

Količino in kvaliteto DNA smo preverili z 1 % agarozno gelsko elektroforezo, barvanjem v etidijevem bromidu in pregledom pod UV svetlobo.

Preglednica 4: Uporabljeni specifični začetni oligonukleotidi

Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5' – 3'	Referenca
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTAG	Heuer in Smalla, 1997
927r	CCGTCAATTCCTTTYAGTT	Heuer in Smalla, 1997
Nspira – 705r	GGCCTTCYTCCCGAT	Freitag in sod., 2005
NSR 1113f	CCTGCTTTCAGTTGCTACCG	Dionisi in sod., 2002
NSR 1264r	GTTTGACAGCGCTTTGTACCG	Dionisi in sod., 2002
<i>amoA</i> – 1f	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Siripong in Rittmann, 2007
<i>amoA</i> – 2r	CCCCTGCYGYAAAGCCTTCTTC	Siripong in Rittmann, 2007

3.7.4 Čiščenje PCR produktov

PCR produkte genov za 16S rRNA in *amoA* smo ločili z 1,5 % agarozno gelsko elektroforezo. Barvanje z etidijevim bromidom nam je omogočilo, da smo ob UV svetlobi izrezali željeni PCR produkt. Iz gela smo PCR produkt izolirali z QIAquick PCR Gel Extraction Kit (QIAGEN, Standford, CA, ZDA) po navodilih proizvajalca. Količino in kvaliteto DNA smo preverili z 1 % agarozno gelsko elektroforezo, barvanjem v etidijevem bromidu in pregledom pod UV svetlobo.

3.8 IZVEDBA T-RFLP IN ANALIZA PROFILOV

3.8.1 Restrikcija PCR produktov

30 μL restriksijske mešanice je vsebovalo 0,5 μL encima, 3 μL 10x pufra, 3 – 7 μL PCR produkta, preostali volumen pa sterilna bidestilirana voda. Za rezanje PCR produktov genov za 16S rRNA vseh bakterij smo uporabili encim *MspI*, za gene za 16S rRNA, značilne za deblo *Nitrospira* pa *HaeIII*. Pripravljene restriksijske mešanice smo inkubirali čez noč pri 37 °C. Za rezanje *amoA* PCR produktov smo uporabili encim *TaqI* in pripravljene restriksijske mešanice inkubirali preko noči pri 65 °C.

3.8.2 Etanolna precipitacija in izvedba T-RFLP

Po inkubaciji smo encima *HaeIII* in *MspI* inaktivirali 20 min pri temperaturi 80 °C, medtem ko za vzorce s *TaqI* ta korak ni bil potreben. Restriksijskim mešanicam smo dodali 3 μL 3M natrijevega acetata, premešali in dodali še 66 μL ledeno hladnega 100 % etanola ter 30 min inkubirali na ledu. Sledilo je pol urno centrifugiranje pri 0 °C in 18000 g. Po odstranitvi supernatanta smo dodali 500 μL 70 % etanola in centrifugirali 10 min pri 4 °C ter 18000 g, odstranili supernatant ter počakali, da etanol izhlapi.

Očiščenim PCR produktom smo dodali 0,5 μL DNA standarda Genescan 500 R0X (Applied Biosystems, Foster City, ZDA) in 10 μL deioniziranega formamida. Pred analizo smo vzorce denaturirali 2 min pri 95 °C, nato pa jih ohladili na ledu. Analizirali smo jih s kapilarno elektroforezo ABI PRISM 30,10 na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.8.3 Analiza T-RFLP profilov

Podatke, dobljene s kapilarno elektroforezo, smo analizirali z bioinformacijskim orodjem Bionumerics 4,61 (Applied Maths, Belgija). Podobnost T-RFLP profilov posameznih vzorcev smo preverjali z Pearsonovim koeficientom korelacije. Drevesa podobnosti smo narisali z metodo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means, slovensko metoda neponderirane aritmetične sredine). Dolžine TF, ki so bile krajše od 50

bp, smo izključili iz analize. Relativno zastopanost smo določili z analizo podatkov v programu Microsoft Office Excel 2007.

3.9 IZDELAVA GENSKE KNJIŽNICE ZA *NITROSPIRA*

Genske knjižnice smo naredili iz aktivnega blata iz reaktorjev R0, R50, R50P, R500, S in B3 pri čemer smo uporabili začetne oligonukleotide 27r in Nspira-705r. Začetne oligonukleotide NSR-1113f in NSR-1264r pa smo uporabili za izdelavo genskih knjižnic iz reaktorjev R0 in R50, saj smo želeli ugotoviti, ali nam drugačen par začetnih oligonukleotidov ter krajše sekvence drugega dela gena za 16S rRNA, omogočijo podobno identifikacijo kot pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma 27r in Nspira-705r.

Očiščene produkte PCR smo klonirali v plazmid pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, ZDA) po navodilih proizvajalca. Iz vsake genske knjižnice smo izbrali 12 klonov, ki so jih sekvencirali (Macrogen Inc., Seoul, Koreja) z uporabo vektorskih začetnih oligonukleotidov SP6 (Promega, Madison, WI, ZDA). Sekvence smo pregledali s Chromas Version 2.3 in jih primerjali s sekvencami v bazi podatkov z uporabo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Sekvence iz baze, ki so se najbolj ujemale s sekvencami klonov, smo uporabili za izdelavo filogenetskega drevesa. Filogenetsko drevo smo izrisali s programom MEGA 4.0, kjer smo uporabili metodo združevanja sosedov (ang. neighbour – joining method), 500 vzorčnih ponovitev ter Kimurin parametrični algoritem (ang. Kimura -2- parameter evolutionary model).

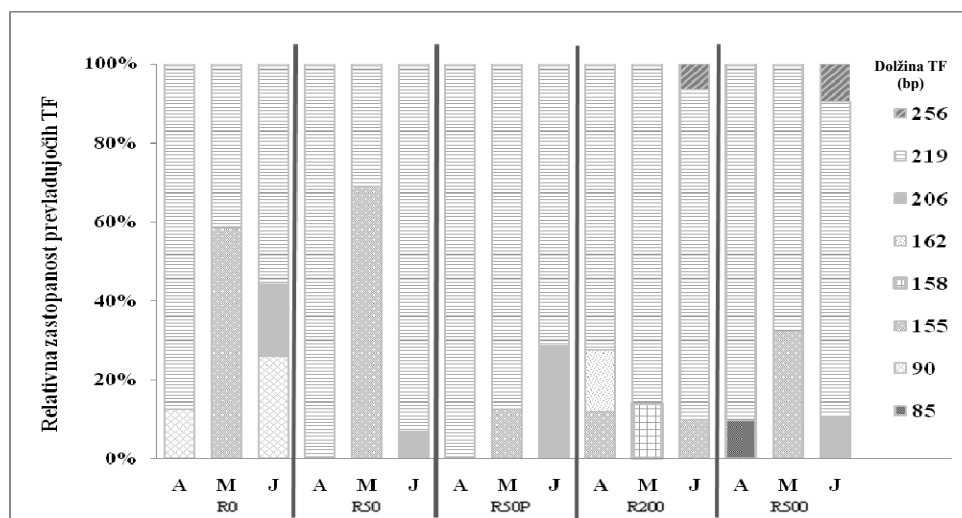
4 REZULTATI

4.1 VPLIV FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN NA STRUKTURO NITRIFIKACIJSKE ZDRUŽBE V AKTIVNEM BLATU BIOREAKTORJEV

Združbo nitrifikacijskih bakterij smo preučevali v petih bioreaktorjih, ki so bili kontinuirno izpostavljeni različnim koncentracijam (0, 50, 200, 500 μgL^{-1}) izbranih farmakoloških učinkovin (ibuprofen, ketoprofen, naproksen, diklofenak, klofibrična kislina).

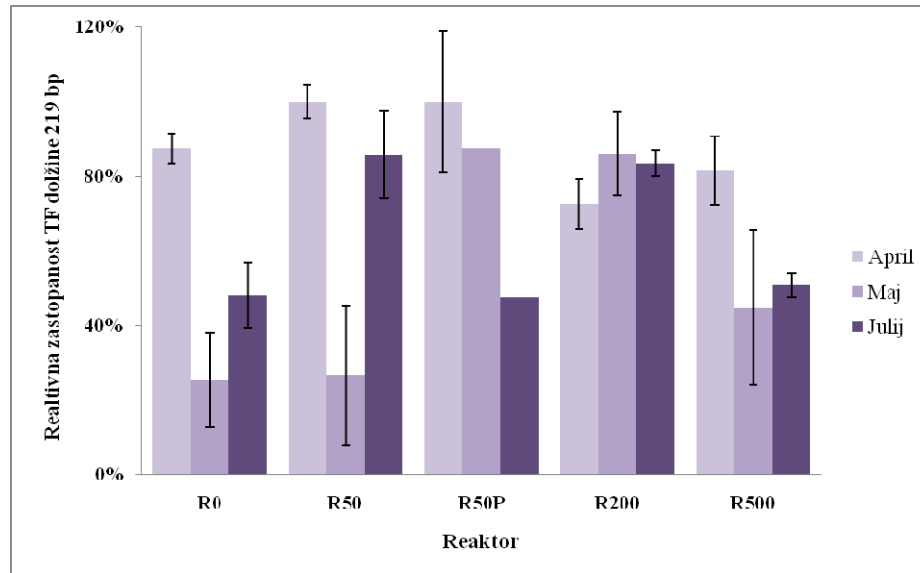
4.1.1 Vpliv farmakoloških učinkovin na strukturo združbe bakterij, ki oksidirajo amonijak (AOB)

Pri analizi strukture združbe AOB v aktivnem blatu, ki smo ga bremenili z različnimi koncentracijami farmakoloških učinkovin, smo PCR pomnožke genov *amoA* očistili z izolacijo iz gela, ker je pri pomnoževanju nastalo več nespecifičnih produktov. Naredili smo analizo T-RFLP in izločili fragmente, ki so predstavljali manj kot 5 % relativne zastopanosti (glede na celoten profil posameznega vzorca) (Slika 5). Rezultati analiz T-RFLP so pokazali, da je v združbi AOB aktivnega blata v vseh reaktorjih prevladoval TF 219 (Slika 5 in 6), razen v maju v R0 in R50, kjer se je povečala relativna zastopanost TF 155.



Slika 5: Prikaz prevladujočih terminalnih fragmentov (TF) značilnih za AOB v reaktorjih (R) z različnimi koncentracijami farmakoloških učinkovin (0, 50 (2 bioreaktorja), 200 in 500 μgL^{-1}) ob treh časih vzorčenja (A - april, M - maj, J - julij)

Poleg TF 219 so bili v več kot 5 % zastopani tudi TF: 85, 90, 155, 158, 162, 206, 256 bp, vendar le ti niso bili zastopani v vseh vzorcih. Relativna zastopanost TF se spreminja po času.

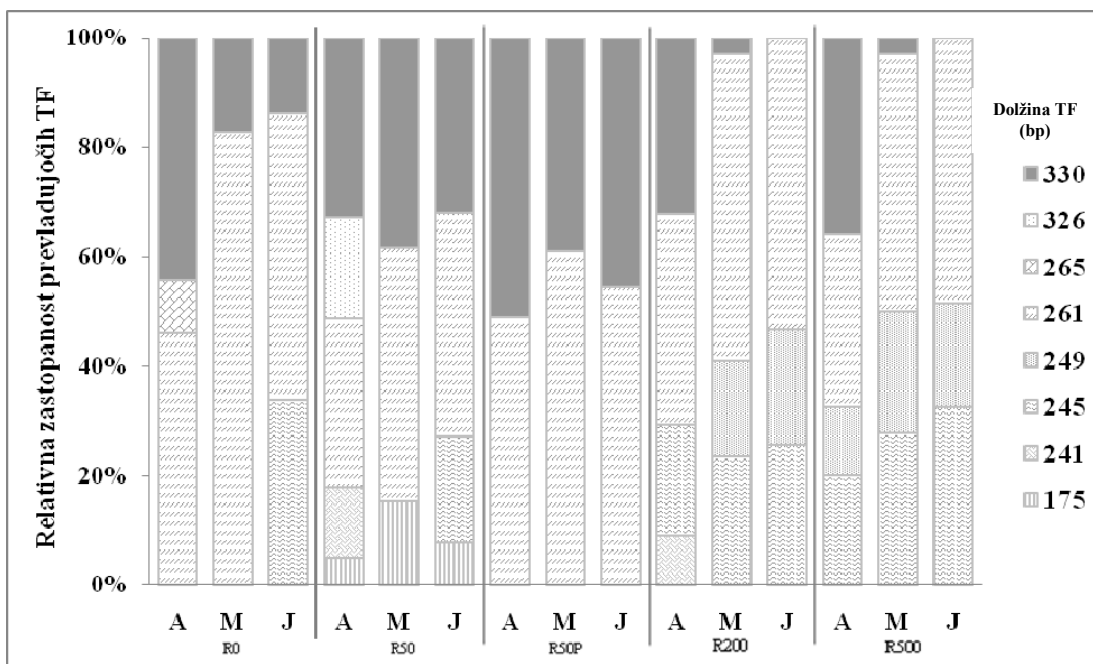


Slika 6: Prikaz relativne zastopanosti terminalnega fragmenta (TF) dolžine 219 bp značilnega za združbo AOB v reaktorjih. Prikazane so aritmetične sredine dveh ponovitev in standardni odkloni

Relativna zastopanost prevladujočega TF dolžine 219 bp je prikazana na Sliki 6, kjer vidimo, da v vseh vzorcih zavzame velik delež. Vendar pa ta delež precej niha v času, tako da vpliv koncentracije farmacevtikov iz naših rezultatov ni razviden.

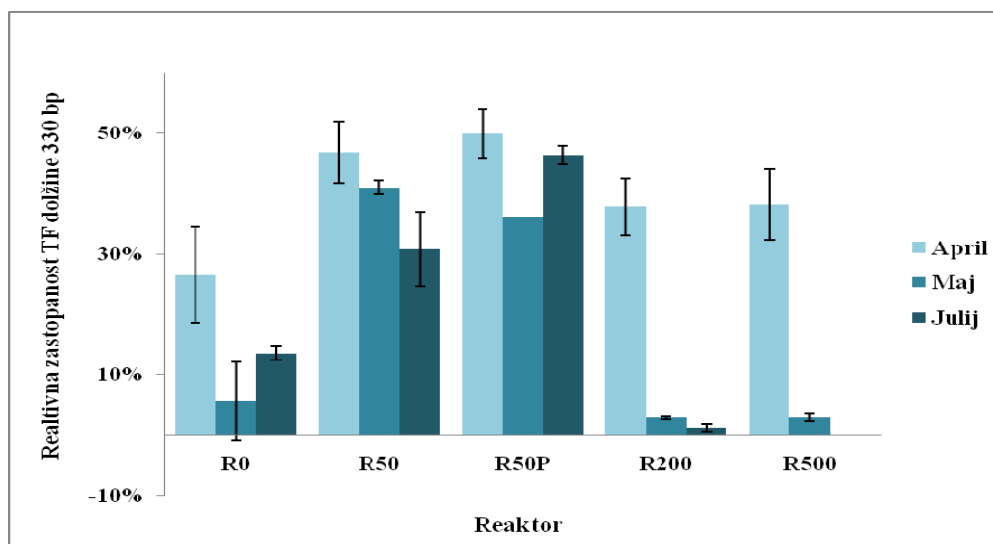
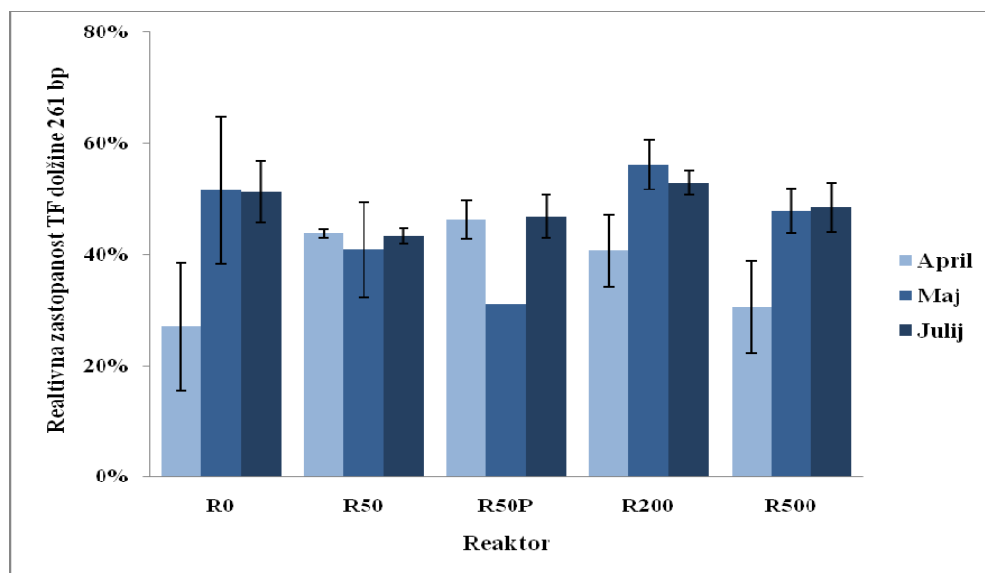
4.1.2 Vpliv farmakoloških učinkovin na strukturo debla *Nitrospira* (analiza T-RFLP)

Pri pomnoževanju gena za 16S rRNA, za *Nitrospira* specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, smo imeli težave, dokler nismo povečali koncentracije BSA in števila ciklov ter časa pri nekaterih ciklih. Analize T-RFLP profilov in predstavitev rezultatov so potekali po že opisanem postopku. Dendrogram T-RFLP profilov je podan v prilogi B, relativna zastopanost terminalnih fragmentov pa je prikazana na Sliki 7 in 8.



Slika 7: Relativna zastopanost posameznih terminalnih fragmentov (TF) značilnih za *Nitrospira* v reaktorjih (R) z različnimi koncentracijami farmakoloških učinkovin (0, 50 (2 bioreaktorja), 200 in 500 μgL^{-1}) ob treh časih vzorčenja (A - april, M - maj, J - julij)

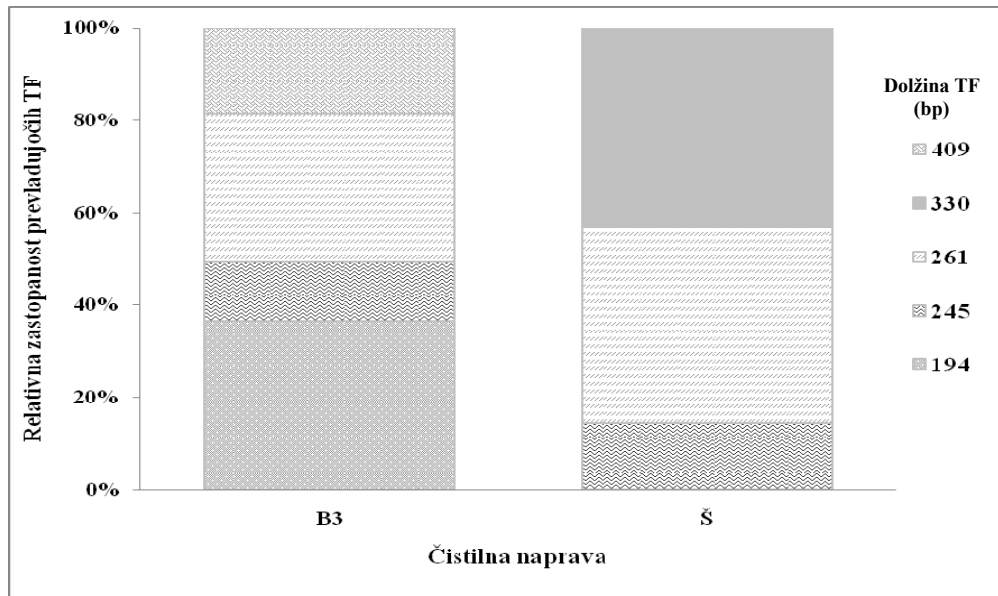
V vseh reaktorjih in ob vseh časih vzorčenja je bil prisoten in večinoma prevladujoč TF z dolžino 261 bp, ki predstavlja podskupino I *Nitrospira*. V vseh reaktorjih in časih vzorčenja (izjema je le R500 julij) smo odkrili tudi TF z dolžino 330 bp, ki predstavlja podskupino II *Nitrospira*. V reaktorjih R200 in R500 sta ob vseh časih prisotna še TF 245 bp in TF 249 bp (izjema je le R200 april, kjer je bil delež TF 249 nižji od 3 %). Ostale TF, ki so še prikazani na Sliki 7, smo zaznali le v enem času vzorčenja v enem ali dveh reaktorjih.



Slika 8: Relativna zastopanost terminalnih fragmentov (TF) dolžin 261bp in 330 bp značilnih za deblo *Nitrospira* v reaktorjih. Prikazane so aritmetične sredine dveh meritev in standardni odkloni.

Slika 8 prikazuje relativno zastopanost podskupine I in podskupine II *Nitrospira* v posameznem reaktorju. Podskupina I je v vseh reaktorjih zastopana v podobnem deležu. Vpliv farmacevtikov se kaže v reaktorjih R50 in R50P s koncentracijo $50 \mu\text{gL}^{-1}$, pri katerih je relativna zastopanost podskupine II večja kot v R0, R200 in R500 (izjema so vrednosti v aprilu, ki pa močno odstopajo od vrednosti v maju in juliju) in se zelo približa deležu podskupine I.

Relativno zastopanost *Nitrospira* smo preverili tudi v aktivnem blatu komunalne ČN Šmarje pri Jelšah (Š) in Rogaška Slatina (B3). Rezultati so prikazani na Sliki 9.



Slika 9: Relativna zastopanost terminalnih fragmentov (TF) *Nitrospira* v aktivnem blatu iz komunalnih čistilnih naprav – Rogaška Slatina, bazen 3 (B3) in Šmarje pri Jelšah (Š).

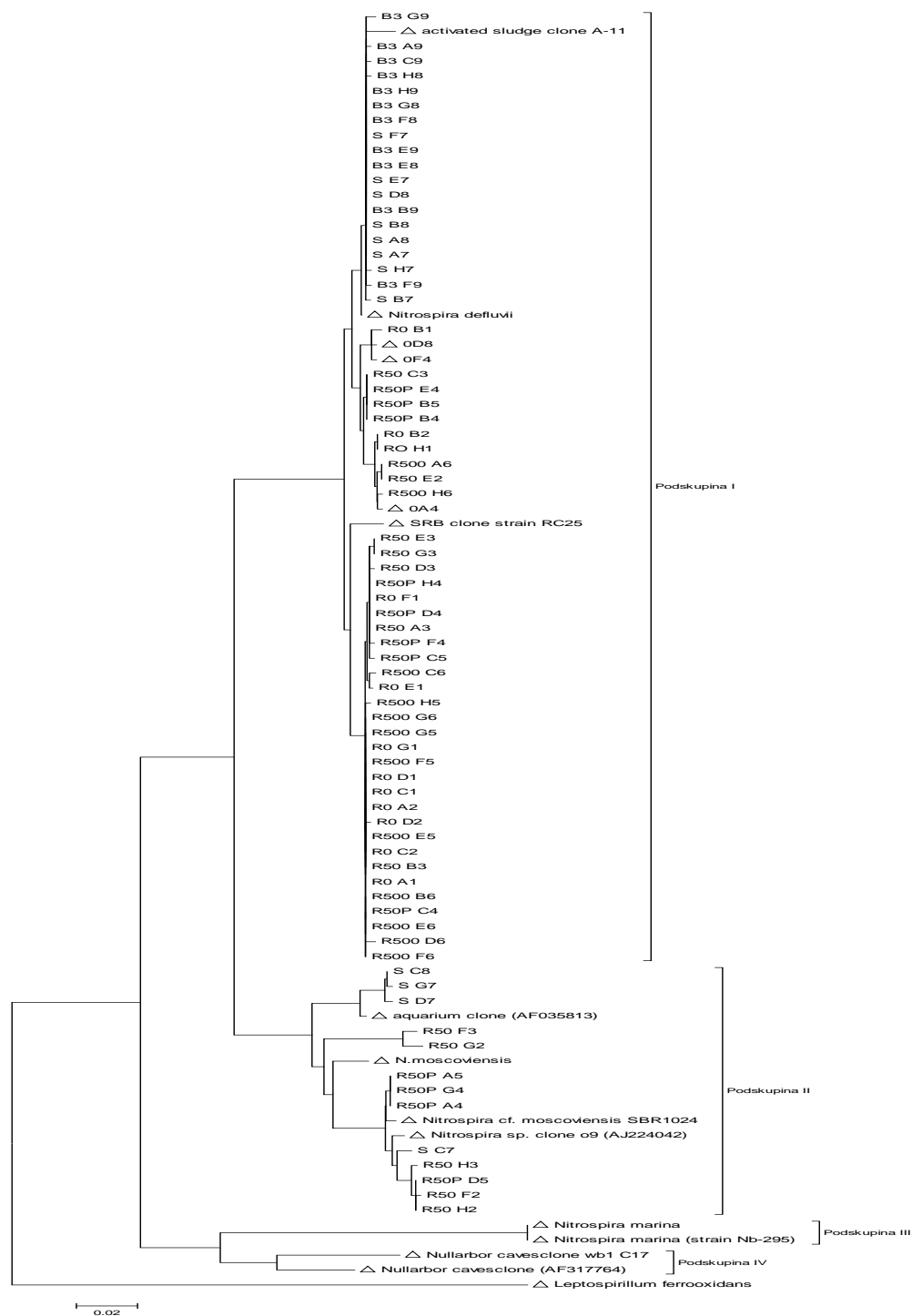
V B3 se pojavita nova TF z dolžinama 194 in 409 bp. Prisotna je podskupina I *Nitrospira* in TF dolžine 245 bp, medtem ko podskupine II *Nitrospira* nismo zaznali. V aktivnem blatu ČN Šmarje pri Jelšah sta podskupini I in II zastopani v zelo podobnem deležu, manjši odstotek pa pripada skupini, za katero je značilen TF z dolžino 245 bp.

4.1.3 Vpliv farmakoloških učinkovin na strukturo debla *Nitrospira* (pogled v diverziteto z gensko knjižnico odsekov genov za 16S rRNA)

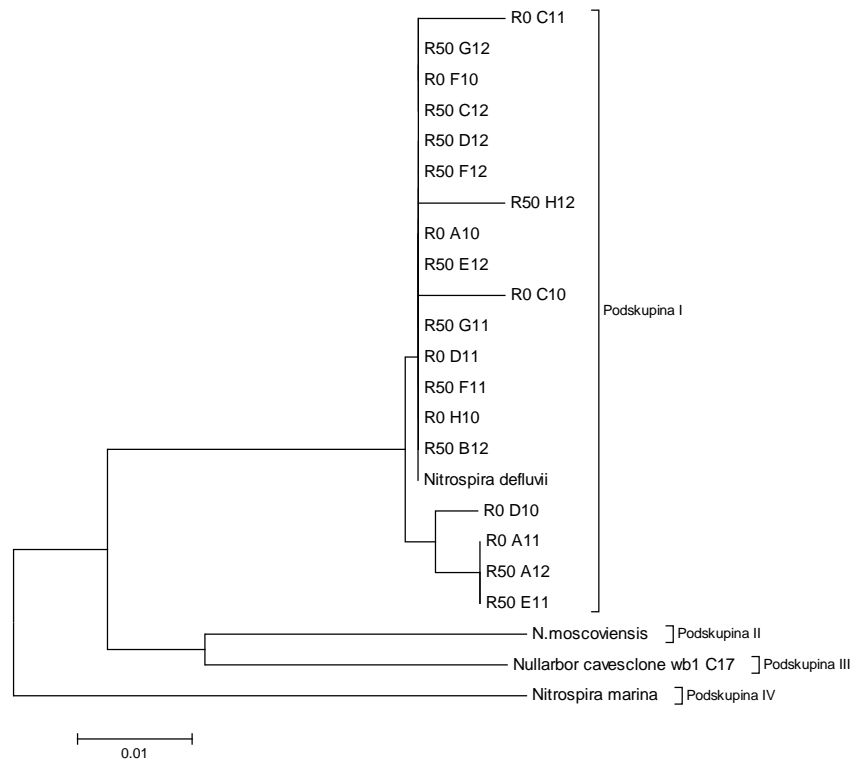
Za natančnejši pregled debla *Nitrospira* v aktivnem blatu bioreaktorjev smo gene, značilne za *Nitrospira*, pomnožili z dvema različnima paroma začetnih oligonukleotidov, in sicer z 27f in N-spira705r ter NSR-1113f in NSR-1264r. Po uspešnem kloniranju in sekvenciranju smo dobljene sekvence analizirali s programskimi orodji za primerjavo sekvenc in filogenetsko analizo. Ločeno glede na uporabljena začetna oligonukleotida smo s programom MEGA4 izrisali dve filogenetski drevesi. V prikaz smo vključili nekaj sekvenc, značilnih za posamezne podskupine *Nitrospira*, kot oddaljeno vrsto pa smo uporabili *Leptospirillum ferrooxidans*.

Na sekvenciranje smo poslali 72 klonov, ki so vsebovali ustrezno dolge dele genov za gene, ki kodirajo 16s rRNA. Pri pregledu dobljenih sekvenc sta bili dve neprimerni, zaradi nepopolne določitve zaporedja, in smo ju iz nadaljnje analize izključili. Na podlagi dobljenih sekvenc smo izrisali drevo, ki je prikazano na Sliki 10. 58 sekvenc se uvršča v podskupino I. V podskupino II *Nitrospira* so se uvrstile le sekvence iz R50 in R50P. Tri sekvence klonov, pridobljene iz komunalne ČN Šmarje pri Jelšah, tvorijo ločeno skupino znotraj podskupine II *Nitrospira*.

S filogenetsko analizo sekvenc, ki smo jih pridobili z uporabo začetnih oligonukleotidov NSR-1113f in NSR-1264r, smo želeli ugotoviti, ali nam drugačen par začetnih oligonukleotidov ter krajše sekvence drugega dela gena za 16S rRNA, omogočijo podobno identifikacijo kot daljše sekvence. Na sekvenciranje smo poslali 12 klonov iz R0 in 12 klonov iz R50. Od skupno 24 sekvenc smo jih za filogenetsko analizo lahko uporabili 19. Vse sekvence so si bile zelo sorodne in kot je prikazano na filogenetskem drevesu (Slika 11), se vse uvrščajo v podskupino I *Nitrospira*.



Slika 10: Filogenetska analiza sekvenc genov za 16S rRNA, značilnih za *Nitrospira*, pridobljenih iz aktivnega blata, bremenjenega s farmakološkimi učinkovinami. Za pomnoževanje gena za 16S rRNA, značilnega za *Nitrospira sp.*, smo uporabili začetna oligonukleotida 27f in N-spira705r. Oznake: R ponazarja bioreaktorje, številka za R pomeni koncentracijo dodanih farmakoloških učinkovin; S – kloni iz aktivnega blata komunalne ČN Šmarje pri Jelšah, B3 – kloni iz aktivnega blata komunalne ČN Rogaška Slatina iz bazena 3

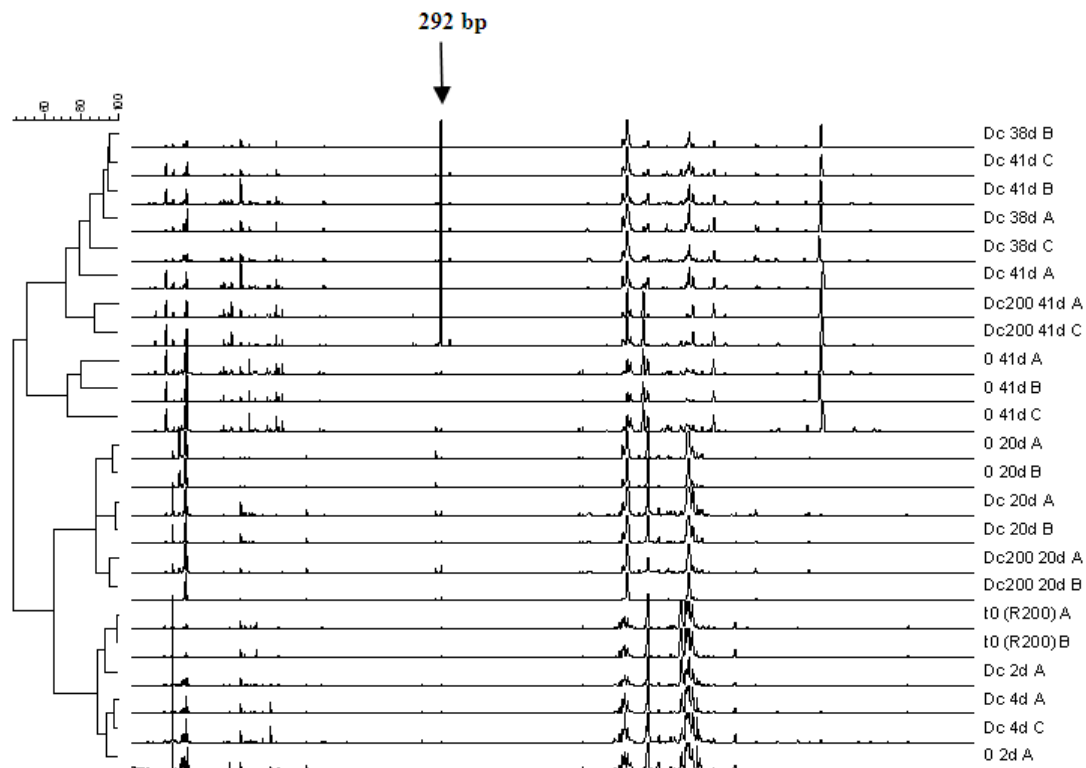


Slika 11: Filogenetska analiza sekvenc genov za 16S rRNA, značilnih za *Nitrospira*, pridobljenih iz aktivnega blata, bremenjenega s farmakološkimi učinkovinami. Za pomnoževanje genov za 16S rRNA, značilnega za *Nitrospira sp.*, smo uporabili začetna oligonukleotida NSR-1113f in NSR-1264r. Oznake: R0 – kloni iz aktivnega blata iz bioreaktorja brez dodanih farmakoloških učinkovin, R50 – kloni iz aktivnega blata iz bioreaktorja z dodanimi farmakološkimi učinkovinami v koncentraciji 50 μgL^{-1} ; S – kloni iz aktivnega blata komunalne ČN Šmarje pri Jelšah, B3 – kloni iz aktivnega blata komunalne ČN Rogaška Slatina iz bazena 3

4.2 VPLIV DIKLOFENAKA NA BAKTERIJSKE ZDRUŽBE V AKTIVNEM BLATU

4.2.1 Vpliv diklofenaka na bakterijsko združbo

Aktivno blato iz reaktorja R200 (označen je kot $t_0(R200)$) smo nacepili v erlenmajerice in postopno višali koncentracijo diklofenaka do $5000 \mu\text{gL}^{-1}$. Sestavo te bakterijske združbe smo primerjali z združbo v erlenmajericah brez in z $200 \mu\text{gL}^{-1}$ diklofenaka. V različnih časovnih točkah smo strukturo združbe preverili z metodo T-RFLP. Dobljene rezultate smo analizirali z bioinformatičnim orodjem Bionumerics 4.61 in jih prikazali na dendrogramu (Slika 12).

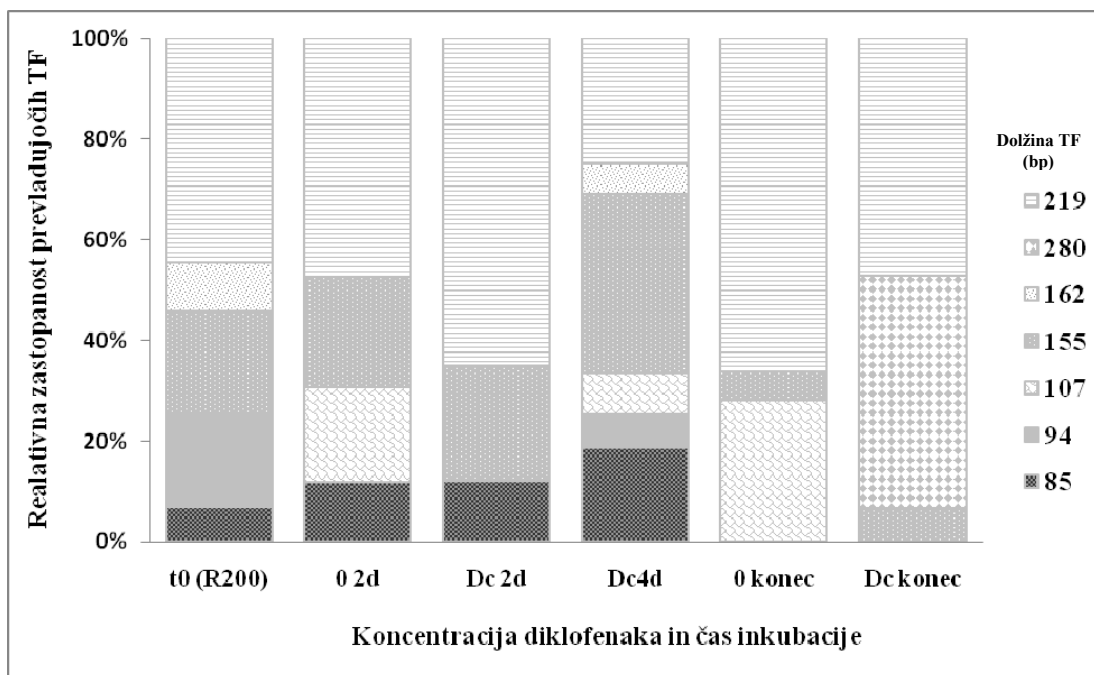


Slika 12: Primerjava profilov T-RFLP bakterijskih združb v aktivnem blatu, inkubiranem pri različnih koncentracijah diklofenaka. Oznake: $t_0(R200)$ – vzorec iz reaktorja R200, 0 – vzorci brez dodanega diklofenaka, Dc200 – vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji $200 \mu\text{gL}^{-1}$, Dc 2d in Dc 4d – vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji $1000 \mu\text{gL}^{-1}$, Dc 20d - vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji $5000 \mu\text{gL}^{-1}$, Dc 38d in Dc 41d - vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji $5000 \mu\text{gL}^{-1}$ in iz WW je bil po 20. dneh odvzet organski ogljik. 2d, 4d, 20d, 38d in 41označujejo dan vzorčenja od začetka inkubacije, po 20. dneh umetna WW ne vsebuje organskega ogljika; A,B,C so ponovitve vzorčenja

Ob začetku inkubacije je bila struktura bakterijske združbe v vseh vzorcih (to (R200), 02d, Dc2d in Dc4d) zelo podobna. Po 20. dneh inkubacije se je združba v vseh vzorcih spremenila glede na začetek inkubacije (tvori novo skupino na dendrogramu), nismo pa zaznali vpliva diklofenaka, saj so si bili vsi vzorci po 20. dneh inkubacije med seboj zelo podobni. Ob koncu inkubacije (po 38. oz. 41. dneh) se je združba v vseh vzorcih še nadalje spremenila, pokazal pa se je tudi vpliv diklofenaka. In sicer je najbolj opazna razlika pri fragmentu dolžine 292 bp, ki je prisoten (v precejšnjem deležu) pri vseh vzorcih, ki so bili inkubirani z diklofenakom (neodvisno od koncentracije). Velikost TF je bila določena iz tabel analize T-RFLP, pri čemer predpostavljamo, da se lahko dolžina razlikuje za velikost baznega para ali več. Fragmenta dolžine 292 bp pri vzorcih, ki so bili inkubirani brez diklofenaka, skoraj ne zaznamo. To in pa še nekatere manjše spremembe v strukturi kažejo na vpliv diklofenaka na spremembe strukture celotne bakterijske združbe v aktivnem blatu, ki je bilo inkubirano v erlenmajericah.

4.2.2 Vpliv diklofenaka na amonij - oksidirajoče bakterije (AOB)

PCR produkte smo očistili z izrezovanjem iz gela ter nato izvedli analizo T-RFLP. Relativno zastopanost prevladujočih terminalnih fragmentov AOB skupin smo prikazali na Sliki 13, medtem ko je dendrogram T-RFLP analize podan v prilogi C, v prilogi D pa je grafični prikaz prevladujočih TF z aritmetičnimi sredinami dveh ponovitev in standardnimi odkloni.



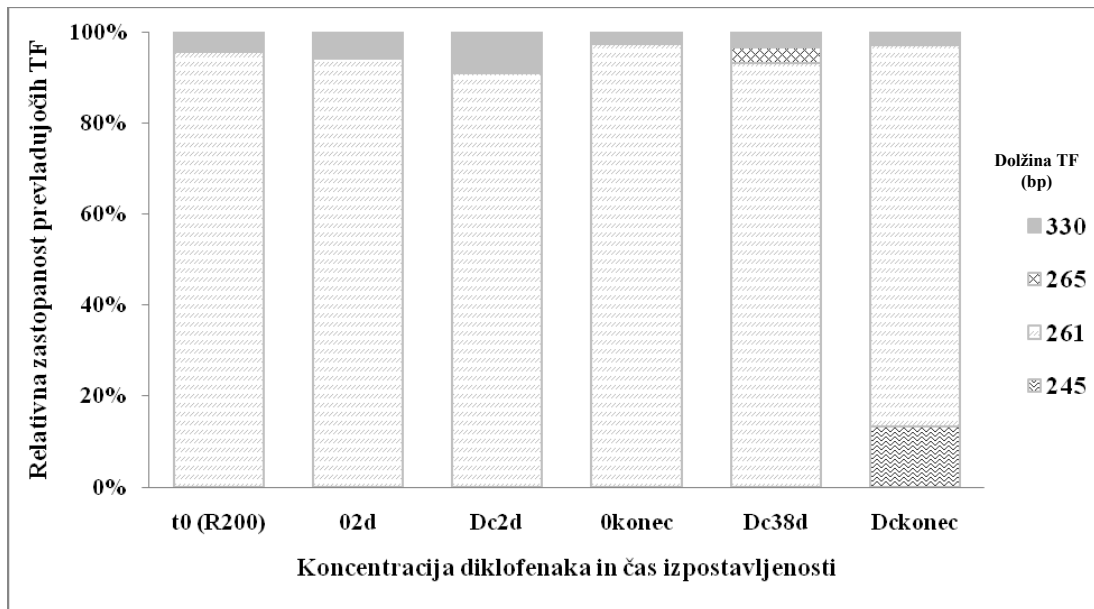
Slika 13: Relativna zastopanost prevladujočih terminalnih fragmentov (TF) v združbi AOB pod vplivom inkubacije z/brez diklofenaka. Oznake: t₀(R200) – vzorec iz reaktorja R200, 02d in 0konec – vzorca brez dodanega diklofenaka inkubirana 2d oziroma 41dni, Dc 2d in Dc 4d – vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji 1000 µg L⁻¹ 2 oziroma 4 dni, Dc konec - vzorec aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji 5000 µg L⁻¹ 41 dni v WW, kateri je bil po 20. dneh odvzet organski ogljik

V vzorcih z dodanim diklofenakom in v vzorcu t₀ (R200) sta bila prisotna TF z dolžinama 155 bp (prisotnost upada s časom) in 219 bp. V vzorcih vzorčenih na začetku inkubacije in v t₀ (R200) je bil prisoten tudi TF dolžine 85 bp, njegova prisotnost pa s časom upade. V več kot 5% relativne zastopanosti smo našli še nekatere TF-je (94,107,162 bp), vendar je njihova variabilnost zelo velika. Samo v vzorcu Dckonec (41 dni inkubacije), kjer je bila najvišja koncentracija diklofenaka (5000 µg L⁻¹), velik delež zavzame TF z dolžino 280 bp.

Glede na variabilnost rezultatov ne moremo reči, da smo zaznali večji vpliv diklofenaka na večino prevladujočih terminalnih fragmentov (skupin AOB), največja razlika se kaže v fragmentu dolžine 280 bp, ki smo ga v velikem deležu zaznali le v vzorcu aktivnega blata, ki je bilo 41 dni izpostavljeno visoki koncentraciji diklofenaka.

4.2.3 Vpliv diklofenaka na predstavnike debla *Nitrospira*

Vpliv diklofenaka na *Nitrospira* smo prav tako preverili z analizo T-RFLP. Rezultate smo predstavili v obliki grafičnega prikaza relativne zastopanosti (Slika 14) in v obliki dendrograma (priloga E).



Slika 14: Relativna zastopanost prevladujočih terminalnih fragmentov (TF) *Nitrospira* sp. ob različnih časih inkubacije z oz. brez diklofenaka. Označe: t₀(R200) – vzorec iz reaktorja R200, 02d in 0konec – vzorca brez dodanega diklofenaka po 2 dnevni oziroma 41 dnevni inkubaciji, Dc 2d – vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji 1000 µgL⁻¹ 2 dni, Dc38d in Dc konec - vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji 5000 µgL⁻¹ 38 oziroma 41 dni in inkubirani v WW, kateri je bil po 20. dneh odvzet organski ogljik

V vseh vzorcih je prevladoval terminalni fragment dolžine 261 bp (predstavlja podskupino I *Nitrospira*), ki prevladuje tudi v R200, od koder smo del aktivnega blata odvzeli in uporabili kot inokulum pri tem poskusu. V vseh vzorcih smo našli tudi terminalni fragment dolžine 330 bp (podskupina II *Nitrospira*), ki pa je bil prisoten v nizkem deležu (glej priloga F, kjer je grafični prikaz prevladujočih TF z aritmetičnimi sredinami dveh ponovitev in standardnimi odkloni). Ostala prikazana TF-ja smo zaznali le ob koncu inkubacije v vzorcih z dodanim diklofenakom. Prikazani rezultati nam tako kažejo, da inkubacija z diklofenakom nima večjega vpliva na spremembe v deležih terminalnih fragmentov dolžin 261 bp in 330 bp (*Nitrospira* podskupina I in II).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Proizvodnja in uporaba plastike, izdelkov za osebno higieno, čistil in produktov farmacije v zadnjih letih močno narašča. Zaradi negativnega vpliva farmacevtikov na okolje, njihove dolge dobe transformacije in razgradnje se večja število raziskav na to tematiko. Poglavitni vir zbiranja in zadrževanja omenjenih snovi so vodna okolja, ki jih poskušamo očistiti s čistilnimi napravami (Petrović in sod., 2003).

Poraba farmakoloških produktov se je v zadnjih letih močno povečala (Ternes, 1998; La Farre in sod., 2001), s čimer se večajo tudi njihove koncentracije, ki dosežejo čistilne naprave. Farmakološke učinkovine se razgrajujejo v čistilnih napravah (Zwiener in Frimmel, 2003; Kosjek in sod., 2007) in vplivajo na bakterijsko združbo v aktivnem blatu (Kraigher in sod., 2008).

Pomembno vlogo pri čiščenju odpadne vode imajo nitrifikacijske bakterije katerih aktivnost in številčnost je odvisna od številnih fizikalnih in kemičnih parametrov (Okabe in sod., 1999). Vpliv izbranih farmakoloških sredstev (ibuprofen, ketoprofen, diklofenak, naproksen in klofibrična kislina) na amonij – oksidirajoče bakterije in *Nitrospira*, ki spada med nitrit – oksidirajoče bakterije, smo preverili z analizo T-RFLP omenjenih skupin v aktivnem blatu, ki je bilo izpostavljeno različnim koncentracijam farmakoloških učinkovin v bioreaktorjih. Poleg tega smo sestavo *Nitrospira* preučili tudi s kloniranjem in analizo genov za 16S rRNA iz aktivnega blata s farmacevtiki bremenjenih bioreaktorjev. Nadalje smo bakterijsko združbo, AOB in skupino *Nitrospira* analizirali s T-RFLP aktivnega blata, ki je bilo izpostavljeno vplivu diklofenaka v erlenmajericah do 41 dni .

5.1 VPLIV FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN NA AOB IN *NITROSPIRA* SP.

5.1.1 Vpliv farmakoloških učinkovin na AOB

V združbi AOB je bil v vseh vzorcih prisoten terminalni fragment dolžine 219 bp, ki je po navajanju Siriponga in Rittmanna (2007) značilen za skupino *Nitrosomonas*

europaea/eutropha. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko predpostavimo, da je skupina *N. europaea/eutropha* prevladujoča tudi v združbi, ki je bila izpostavljena farmakološkim sredstvom. Morebitnega vpliva izbranih farmakoloških učinkovin na skupino *N. europaea/eutropha* pa ne moremo potrditi, saj relativna zastopanost TF dolžine 219 bp niha po času. Časovna variabilnost je zelo velika tudi pri ostalih TF, ki so bili v združbi AOB zastopani v več kot 5 %. Zaradi velike variabilnosti je težko z gotovostjo sklepati o vplivu farmakoloških učinkovin na AOB združbo. Primerjava z drugimi študijami ni možna, saj je to prva analiza vpliva farmakoloških učinkovin na AOB.

5.1.2 Vpliv farmakoloških učinkovin na skupino *Nitrospira*

V primerjavi s profili AOB združbe so bili profili *Nitrospira* primernejši za analizo, kar bi lahko bila posledica izrazito manjšega števila nespecifičnih produktov, ki nastanejo pri pomnoževanju gena za 16S rRNA, značilnega za *Nitrospira*. Predstavniki podskupine I so v primerjavi z ostalimi podskupinami prevladujoči v aktivnem blatu (Wagner in Loy, 2002; Maixner in sod., 2006), prevladujejo pa tudi v aktivnem blatu bremenjenem z višjimi koncentracijami farmakoloških učinkovin. V skoraj vseh časih vzorčenja je bil prisoten tudi TF dolžine 330 bp (vendar večinoma v precej nižji relativni zastopanosti), ki je značilen za podskupino II *Nitrospira*. Relativna zastopanost podskupine II se ob prisotnosti farmakoloških učinkovin v koncentraciji $50 \mu\text{gL}^{-1}$ poveča v primerjavi z vzorci, kjer niso bile dodane farmakološke učinkovine oziroma je bila koncentracija 200 ali $500 \mu\text{gL}^{-1}$. Porast relativne zastopanosti bi lahko bila posledica miksotrofne rasti nekaterih predstavnikov *Nitrospira*. Predstavniki podskupine II so prilagojeni na nižje koncentracije nitrita, kjer nitrit izkoristijo kot donor elektronov za avtotrofno rast (Maixner in sod., 2006). Farmakološke učinkovine bi lahko predstavniki podskupine II uporabili kot vir ogljika, s čimer bi bila povečana hitrost rasti ter relativna številčna zastopanost. Farmakološke učinkovine v koncentraciji večji od $200 \mu\text{gL}^{-1}$ na podlagi dobljenih rezultatov negativno vplivajo na podskupino II, saj se opazno zmanjša njena relativna zastopanost. Z zmanjšanjem relativne zastopanosti podskupine II *Nitrospira* opazen delež zavzameta TF dolžine 245 in 249 bp za katera ni poznano, da bi predstavljala katero podskupino. TF dolžine 245 bp je občasno prisoten tudi v vzorcih z nižjimi

koncentracijami dodanih farmakoloških učinkovin, medtem ko je TF dolžine 249 prisoten le pri koncentraciji 200 in 500 μgL^{-1} .

Na sestavo združbe *Nitrospira* bi lahko vplivale tudi razlike v fizikalno kemičnih pogojih med delovanjem bioreaktorjev in komunalnih čistilnih naprav. V aktivnem blatu komunalne ČN Šmarje pri Jelšah smo našli TF značilne za podskupino I in II *Nitrospira*, visok delež pa zavzame tudi TF dolžine 245 bp. V sestavi *Nitrospira* sp. iz aktivnega blata komunalne ČN Rogaška Slatina (B3) opazen delež zavzameta TF, ki nista prisotna pri bioreaktorjih in ČN Šmarje pri Jelšah, ter podskupina I. Razlog za razlike bi lahko iskali v sestavi odpadne vode, saj na ČN Rogaška Slatina pritekajo odplake iz različnih podjetij (kozmetično podjetje, pralnice, steklarna, terme, podjetja z živilsko predelavo, dom ostarelih, zdravstveni dom,...), medtem ko na ČN Šmarje pri Jelšah doteka predvsem odpadna voda iz gospodinjstev.

Za natančnejši pregled *Nitrospira* v aktivnem blatu, bremenjenem s farmakološkimi učinkovinami, ter v aktivnem blatu iz komunalnih ČN, smo naredili knjižnico genov 16S rRNA in pridobljene sekvence filogenetsko analizirali. Uporabili smo dva različna para začetnih oligonukleotidov, s čimer smo preverili vpliv začetnih oligonukleotidov na sestavo končnih produktov PCR. NSR – 1113f in NSR – 1264r v primerjavi z 27f in N-spira 705r pomnožuje različne dele gena za 16S rRNA ter da krajši produkt PCR. Sekvence pomnožene z 27f in N-spira 705r, so v večini primerov spadale v podskupino I. Večina teh sekvenc je bilo zelo sorodnih vrsti *Nitrospira defluvii*. V podskupino II so se uvrstile sekvence iz bioreaktorjev, kjer so bila dodana farmakološka sredstva v koncentraciji 50 μgL^{-1} in iz ČN Šmarje pri Jelšah. Od sekvenc v podskupini II po sorodnosti nekoliko odstopajo tri sekvence iz aktivnega blata ČN Šmarje pri Jelšah. Filogenetska analiza sekvenc tako sovпада z analizo T-RFLP, kjer podskupina II tudi predstavlja opazen delež v bioreaktorjih R50, R50P in v ČN Šmarje pri Jelšah.

S filogenetsko analizo sekvenc krajšega dela gena za 16S rRNA *Nitrospira* pridobljenih z drugim parom začetnih oligonukleotidov smo ugotovili, da se vse sekvence uvrščajo v podskupino I *Nitrospira* in so večinoma sorodne vrsti *N. defluvii*. Velika medsebojna

podobnost krajših sekvenc tako nakazuje na slabšo identifikacijsko moč tega postopka v primerjavi z analizo daljših sekvenc.

Primerjava z drugimi študijami tudi v tem primeru ni možna, saj je to prva analiza vpliva farmakoloških učinkovin na podskupine *Nitrospira*.

5.2 VPLIV DIKLOFENAKA NA CELOTNO BAKTERIJSKO ZDRUŽBO IN ZDRUŽBO NITRIFIKATORJEV

Diklofenak se v odpadni vodi zelo slabo razgrajuje in vpliv te spojine na bakterijsko združbo aktivnega blata ni poznan. Preverili smo vpliv diklofenaka na bakterijsko združbo, AOB in *Nitrospira* z inkubacijo aktivnega blata v erlenmajericah ob prisotnosti diklofenaka in analizirali združbe s T-RFLP.

Rezultati te raziskave so pokazali, da inkubacija aktivnega blata v prisotnosti visokih koncentracij diklofenaka (do $5000 \mu\text{gL}^{-1}$) in brez dodatnega vira ogljika vpliva na združbo bakterij, saj se pojavi nov TF 292 pri vseh testiranih paralelkah z diklofenakom. Omenjeni fragment ni opazno prisoten v vzorcih brez diklofenaka, kar nakazuje na bakterijsko skupino, pri kateri se vpliv diklofenaka pozitivno izraža, kar bi lahko bila tudi posledica uporabe diklofenaka kot vira energije.

Združba AOB, ki je bila bremenjena s farmakološkimi učinkovinami v koncentraciji $200 \mu\text{gL}^{-1}$, se je v primerjavi z združbo v R200 spremenila, kar je lahko posledica prenosa le dela aktivnega blata iz bioreaktorja v erlenmajerico oziroma sprememba nekaterih faktorjev inkubacije (npr. mešanje, koncentracija in vrsta farmakološke učinkovine). V vseh vzorcih opazen delež zavzameta TF dolžin 219 bp, ki je značilen za skupino *N. europaea/eutropha*, in 155 bp. V vzorcih so prisotni še nekateri TF, katerih variabilnost je zelo velika. Glede na variabilnost rezultatov ne moremo reči, da ima diklofenak vpliv na prevladujoče skupine AOB. Opazna razlika je edino v vzorcu, kjer je bilo aktivno blato izpostavljeno visoki koncentraciji diklofenaka ($5000 \mu\text{gL}^{-1}$) in je bil odpadni vodi odvzet organski ogljik. V tem vzorcu se je pojavil nov TF dolžine 280 bp, ki je bil zastopan v podobnem deležu kot skupina *N. europaea/eutropha*. Z upoštevanjem morebitne napake

pri določitvi dolžine TF, bi lahko TF dolžine 280 bp ponazarjal prisotnost skupine 6 *Nitrospira* sp., saj Siripong in Rittmann (2007) navajata, da je zanjo značilen TF dolžine 283 bp. Pozitiven vpliv na skupino, ki jo ponazarja TF dolžine 280 bp, bi lahko imela visoka koncentracija diklofenaka ($5000 \mu\text{gL}^{-1}$) ali odvzet organski ogljik, saj ta skupina ni prisotna v ostalih vzorcih in tudi ne v združbi AOB iz aktivnega blata bioreaktorjev.

Diklofenak glede na naše rezultate ne vpliva na podskupino I *Nitrospira*, saj je zanjo značilen TF prevladujoč pri vseh izbranih koncentracijah, kjer njegova relativna zastopanost zavzame zelo podobno vrednost. Prisoten je tudi TF dolžine 330 bp (podskupina II), ki v vseh vzorcih zavzame podobno vrednost katera je zelo nizka. Zelo nizka relativna zastopanost podskupine II je tudi v bioreaktorju z dodanimi farmakološkimi sredstvi v koncentraciji $200 \mu\text{gL}^{-1}$ od koder je bil del aktivnega blata uporabljen kot inokulum za eksperiment v erlenmajericah. Relativna zastopanost podskupine I in podskupine II ne glede na dodano količino diklofenaka (odsotnost diklofenaka oziroma dodan diklofenak v koncentraciji $5000 \mu\text{gL}^{-1}$) ne niha izrazito, na podlagi česar lahko predpostavimo, da diklofenak nima večjega vpliva na podskupino I in podskupino II *Nitrospira*.

5.3 SKLEPI

- Sestava AOB združbe je močno variabilna tako po času kot v posameznih bioreaktorjih, izpostavljenih različnim koncentracijam farmakoloških učinkovin. Zaradi velike variabilnosti ni mogoče sklepati o vplivu farmakoloških učinkovin na združbo AOB. Ne glede na koncentracijo farmakoloških učinkovin in ne glede na čas je med AOB prevladujoča skupina *Nitrosomonas europaea/eutropha*.
- Podskupina I *Nitrospira* prevladuje med predstavniki *Nitrospira* v vseh reaktorjih v aktivnem blatu, bremenjenem s farmakološkimi učinkovinami in v aktivnem blatu brez dodanih farmacevtikov. Relativna zastopanost podskupine II *Nitrospira* se poveča v bioreaktorjih, izpostavljenih farmakološkim učinkovinam v koncentraciji

50 μgL^{-1} , pri višjih koncentracijah oz. brez farmakoloških učinkovin pa je ta delež manjši.

- Zaradi variabilnosti skupin AOB po času ne moremo zagotovo sklepati o vplivu diklofenaka. Opazimo pa povečano relativno zastopanost TF dolžine 280 bp pri inkubaciji z diklofenakom (5000 μgL^{-1}) in brez dodatnega ogljika v primerjavi s kontrolo brez diklofenaka.
- Diklofenak ne vpliva na podskupino I in podskupino II *Nitrospira*, saj se njuna relativna zastopanost, v vzorcu brez diklofenaka in v vzorcu z dodanim diklofenakom v koncentraciji 5000 μgL^{-1} , le rahlo razlikuje.

6 POVZETEK

V tem diplomskem delu smo z analizo T-RFLP preučevali spremembe v mikrobni združbi, združbi amonij – oksidirajočih bakterij ter pri *Nitrospira* v aktivnem blatu, izpostavljenem vplivu različnih koncentracij farmakoloških učinkovin in različnim koncentracijam diklofenaka.

Aktivno blato, bremenjeno s farmakološkimi učinkovinami v koncentraciji $200 \mu\text{gL}^{-1}$, je služilo kot inokulum pri poizkusu v erlenmajericah za preverjanje vpliva različnih koncentracij diklofenaka na bakterijsko in AOB združbo ter na *Nitrospira*.

Zaradi velike variabilnosti skupin AOB ne moremo postaviti trdnih zaključkov o vplivu farmakoloških učinkovin na strukturo AOB. Skupina *Nitrosomonas europaea/eutropha* je prevladujoča v združbi AOB ne glede na koncentracijo dodanih farmakoloških učinkovin. Neodvisno od koncentracije je med *Nitrospira* prevladujoča podskupina I *Nitrospira*. Pri koncentraciji $50 \mu\text{gL}^{-1}$ farmakoloških učinkovin pa smo zaznali višjo relativno zastopanost podskupine II *Nitrospira*, ki je pri ostalih koncentracijah zastopana v veliko nižjem odstotku kot podskupina I. Pri koncentraciji farmakoloških učinkovin $50 \mu\text{gL}^{-1}$ se je delež podskupine II povečal na raven podskupine I *Nitrospira*. Vzroka za to ne poznamo.

Ob visoki koncentraciji diklofenaka se poveča relativna zastopanost bakterijske skupine, ki jo ponazarja TF dolžine 280 bp. Zaradi velike variabilnosti zastopanosti skupin AOB ne moremo prikazati morebitnega vpliva diklofenaka na združbo AOB. Na podskupino I in podskupino II *Nitrospira* diklofenak nima opaznega vpliva, saj kljub različnim koncentracijam ostane njuna relativna zastopanost skoraj nespremenjena.

7 VIRI

Arthur J.W., West K.N., Allen K.N., Hedke S.F. 1987. Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 38: 324 – 331

Blackwood C.B., Marsh T., Sang-Hoon K., Paul E.A. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 926 - 932

Bock E., Koops H.P., Moller U.C., Rudert M. 1990. A new facultatively nitrite oxidizing bacterium, *Nitrobacter vulgaris*. *Archives of Microbiology*, 153: 105 – 110

Bock E., Koops H.P., Ahlers B., Harms H. 1992. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. V: *The prokaryotes*. 2nd ed. Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H. (eds). New York, Springer-Verlag: 414 – 430

Burell P.C., Keller J., Blackall L.L. 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 1878-1883

CČN Domžale – Kamnik. 2009. Proces čiščenja. Domžale, Centralna čistilna naprava (CČN) Domžale – Kamnik: 1 str.
http://www.ccn-domzale.si/index.php?option=com_content&view=article&id=128&Itemid=245&lang=sl (november 2009)

Culman S.W., Gauch H.G., Blackwood C.B., Thies J.E. 2008. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: A comparative study. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 55 - 63

Daims H., Nielsen J.L., Nielsen P.H., Schleifer K. H., Wagner M. 2001. *In situ* characterization of *Nitrospira* – like nitrite oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 5273 - 5284

Dionisi H.M., Layton A.C., Harms G., Gregory I.R., Robinson K.G., Sayler G.S. 2002. Quantification of *Nitrosomonas oligotropha* – like ammonia-oxidizing bacteria and *Nitrospira* spp. from full-scale wastewater treatment plants by competitive PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 245-253

Freitag T.E., Chang L., Clegg C.D., Prosser J.I. 2005. Influence of inorganic nitrogen management regime on the diversity of nitrite-oxidizing bacteria in agricultural grassland soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8323-8334

Gómez M.J., Martínez Bueno M.J., Lacorte S., Fernández – Alba A.R., Agüera A. 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere*, 66, 6: 993 - 1002

- Heuer H., Smalla K. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities. V: Modern soil microbiology. 2nd ed. Van Elsas J.D. Trevors J.T., Wellington E.M.H. (eds.). New York, Marcel Dekker: 353-373
- Hiorns W.D., Hastings R.C., Head I.M., McCarthy A.J., Saunders J.R., Pickup R.W., Hall G.H. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrospiras in the environment. *Microbiology*, 141: 2793 - 2800
- Horz H.P., Rotthauwe J.H., Lukow T., Liesack W. 2000. Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *Journal of Microbiological Methods*, 39: 197-204
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 169-188
- Kirsten K., Bock E. 1993. Close genetic relationship between *Nitrobacter hamburgensis* nitrite oxidoreductase and *Escherichia coli* nitrate reductases. *Archives of Microbiology*, 160: 447 - 453
- Kosjek T., Heath E., Kompare B. 2007. Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1379-1387
- Kraigher B., Kosjek T., Heath E., Kompare B., Mandić-Mulec I. 2008. Influence of pharmaceutical residues on the structure of activated sludge bacterial communities in waste treatment bioreactors. *Water Research*, 42: 4578-4588
- La Farre M., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M., Barcelo D. 2001. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: Methods and preliminary results including toxicity with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography*, 938: 187 – 197
- Madigan M. T., Martinko J. M., 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Maixner F., Noguera D.R., Anneser B., Stoecker K., Wegl G., Wagner M., Daims H. 2006. Nitrite concentration influences the population structure of *Nitrospira*-like bacteria. *Environmental Microbiology*, 8: 1487-1495
- McTavish H., Fuchs J. A., Hooper A. B. 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, 175: 1436 – 2444

Mobarry B.K., Wagner M., Urbin V., Rittmann B.E., Stahl D.A. 1996. Phylogenetic probes for analysing abundance and spatial organisation of nitrifying bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 2156 - 2162

Okabe S., Satoh H., Watanabe Y. 1999. *In situ* analysis of nitrifying biofilms as determined by *in situ* hybridization and the use of microelectrodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3182 – 3191

Park H.D., Noguera D.R. 2004. Evaluating the effect of dissolved oxygen on ammonia-oxidizing bacterial communities in activated sludge. *Water Research*, 38: 3275 - 3286

Petrović M., Gonzalez S., Barcelo D. 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 685 – 696

Prosser J.I. 1989. Autrophic nitrification in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 30: 125 – 181

Rowan A., Snape J.R., Fearnside D., Barer M.R., Curtis T.P., Head I.M. 2003. Composition and diversity of ammonia-oxidising bacterial communities and wastewater treatment reactors of different design treating identical wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 195-206

Sayavedera – Soto L.A., Hommes N.G., Arp. D.J. 1994. Characterization of the gene encoding hydroxylamine oxidoreductase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, 176: 504 - 510

Siripong S., Rittmann B.E. 2007. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 41: 1110-1120

Stenstrom M.K., Song S.S. 1991. Effects of oxygen transport limitation on nitrification in the activated sludge process. *Federal Water Pollution Control*, 63: 208- 219

Ternes T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*, 11: 3245 – 3260

Teske A., Alm E., Regan J.M., Toze S., Rittmann B.E., Stahl D.A. 1994. Evolutionary relationship among ammonia – and nitrite- oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, 176: 6623 - 6630

Tiedje J.M., Asuming-Brempong S., Nüsslein K., Marsh T.L., Flynn S.J. 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13: 109-122

Wagner M., Noguera D.R., Juretschko S., Rath G., Koops H.P., Schleifer K.H. 1998. Combining fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with cultivation and mathematical

modelling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge. *Water Science Technology*, 37: 441 - 449

Wagner M., Loy A. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 218-227

Watson S.W., Waterbury J.B. 1971. Characteristics of two marine nitrite – oxidizing bacteria, *Nitrospina gracilis* nov. gen. nov. sp. and *Nitrococcus mobilis* nov. gen. nov. sp. *Archives of Microbiology*, 77: 203 - 230

Whang L.M., Chien I., Yuan S.L., Wu Y. 2009. Nitrifying community structures and nitrification performance of full-scale municipal and swine wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 75: 234-242

Wu M., Song L., Ren J., Kan J., Qian P. 2004. Assessment of microbial dynamics in the Pearl River Estuary by 16S rRNA terminal restriction fragment analysis. *Continental Shelf Research*, 24: 1925 - 1934

Zwiener C., Frimmel F.H. 2003. Short-term tests with pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibrate, ibuprofen, and diclofenac. *Science of the Total Environment*, 309: 201-211

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Ines Mandić – Mulec in somentorici dr. Barbari Kraigher za pomoč, nasvete, potrpežljivost, prijaznost, strokovno vodenje in natančen pregled diplomske naloge.

Za recenzijo se zahvaljujem prof. dr. Gorazdu Avguštinu.

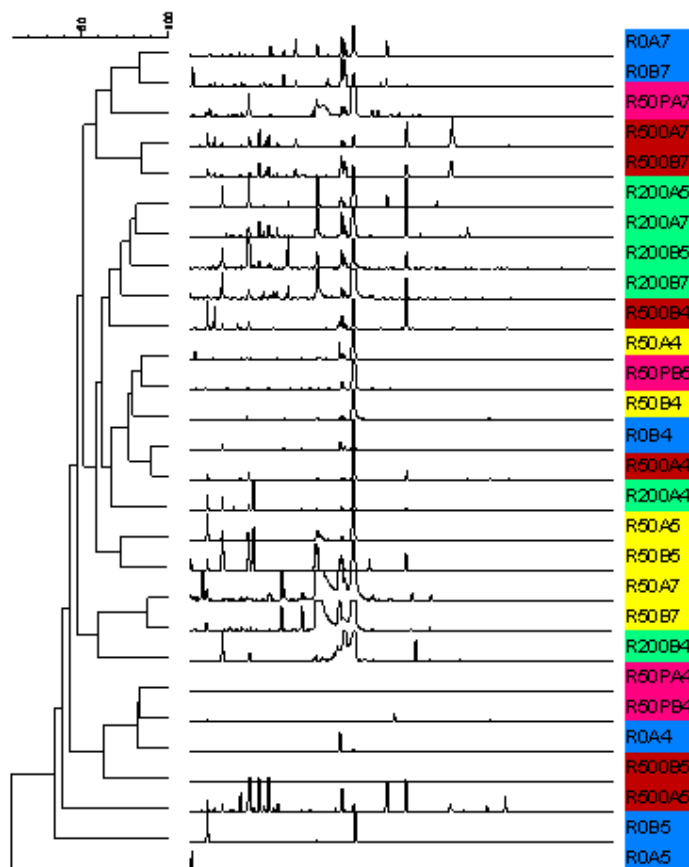
Zaposlenim iz laboratorija Katedre za mikrobiologijo se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu.

Zahvalila bi se rada tudi svoji družini za vso podporo.

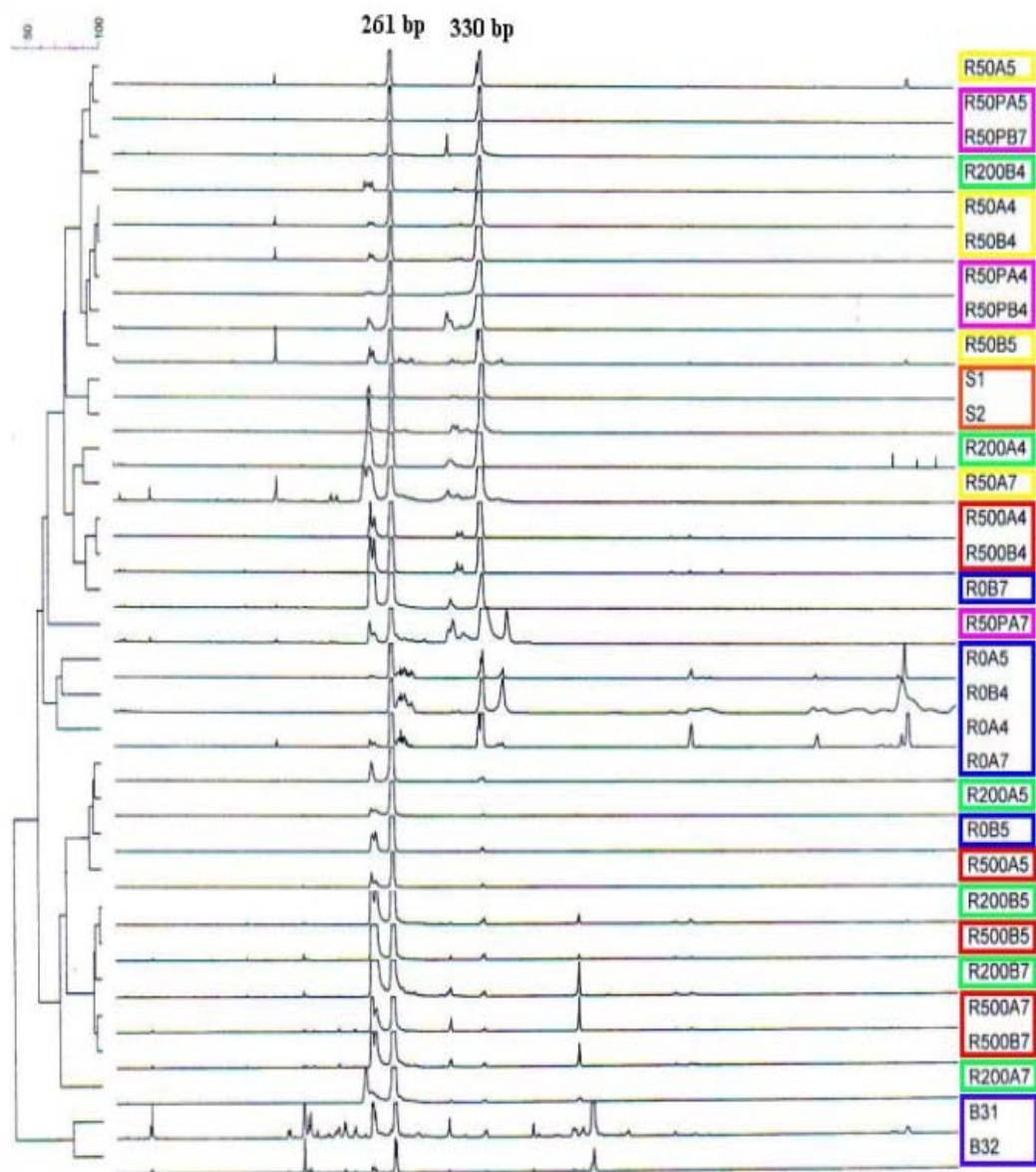
Prav tako se zahvaljujem prijateljem in sošolcem, ki so sodelovali pri ustvarjanju razgibanega mozaika študentskih let.

PRILOGE

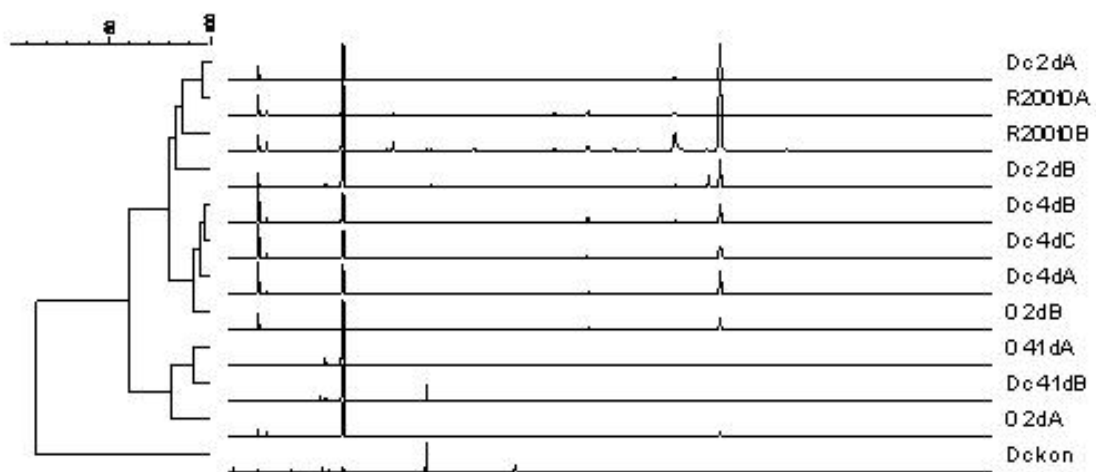
Priloga A: Dendrogram AOB združbe iz aktivnega blata, ki je bil izpostavljen različnim koncentracijam farmakoloških učinkovin



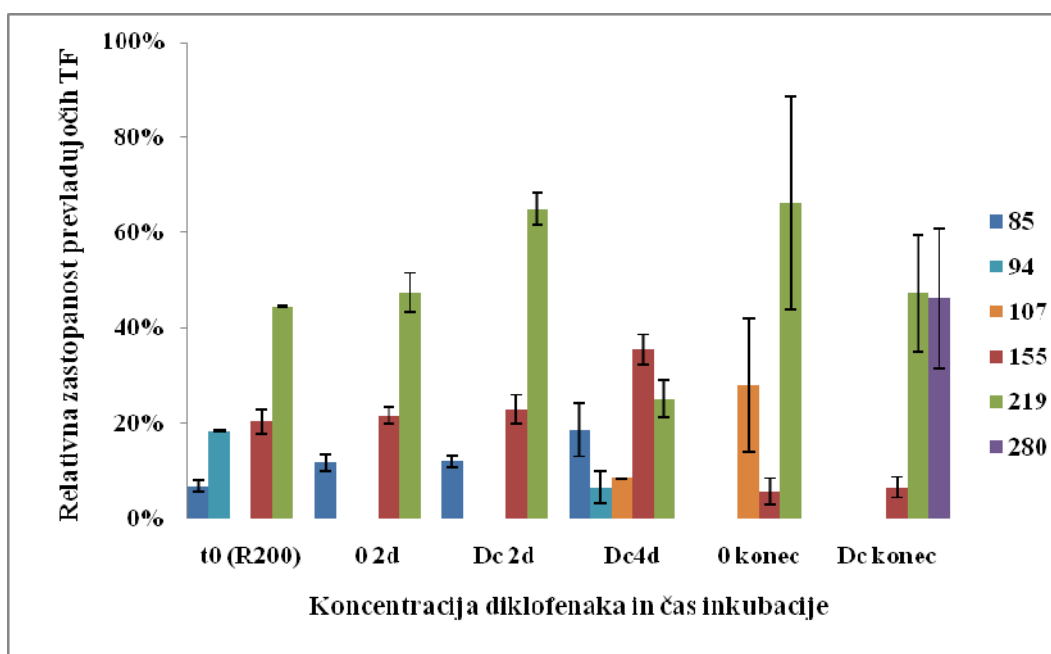
Priloga B: Dendrogram za deblo *Nitrospira* iz aktivnega blata, ki je bil izpostavljen različnim koncentracijam farmakoloških učinkovin



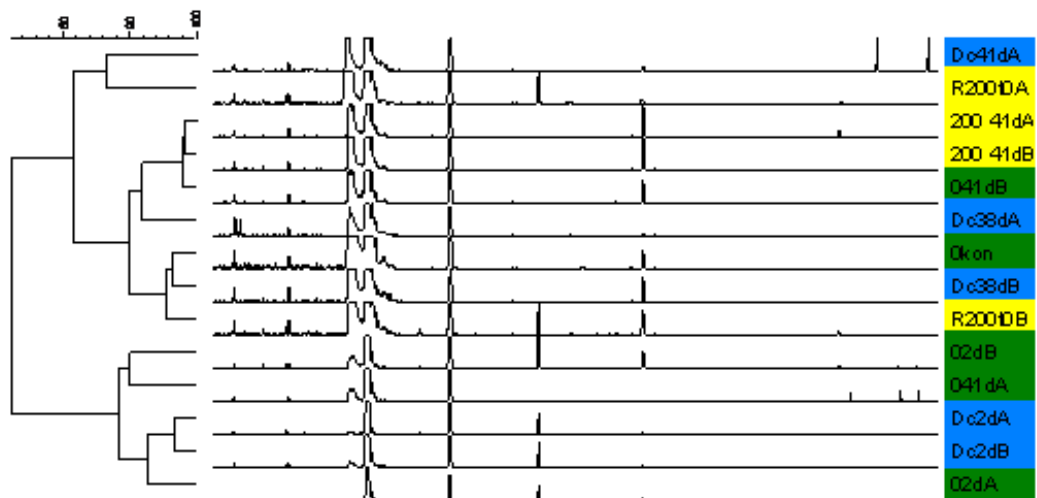
Priloga C: Dendrogram AOB združbe, ki je bila izpostavljena različnim koncentracijam diklofenaka



Priloga D: Prikaz relativne zastopanosti prevladujočih terminalnih fragmentov združbe AOB ob različnih časih inkubacije z/brez diklofenaka. Prikazane so aritmetične sredine dveh ponovitev in standardni odkloni. Oznake: t_0 (R200) – vzorec iz reaktorja R200, 0 – vzorci brez dodanega diklofenaka, Dc 2d in Dc 4d – vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji $1000 \mu\text{gL}^{-1}$, Dc konec - vzorci aktivnega blata izpostavljenega diklofenaku v koncentraciji $5000 \mu\text{gL}^{-1}$, iz WW je odvzet organski ogljik. 2d – konec označujejo dan vzorčenja od začetka inkubacije; od 20. dne inkubacije v umetni WW ni več prisoten organski ogljik

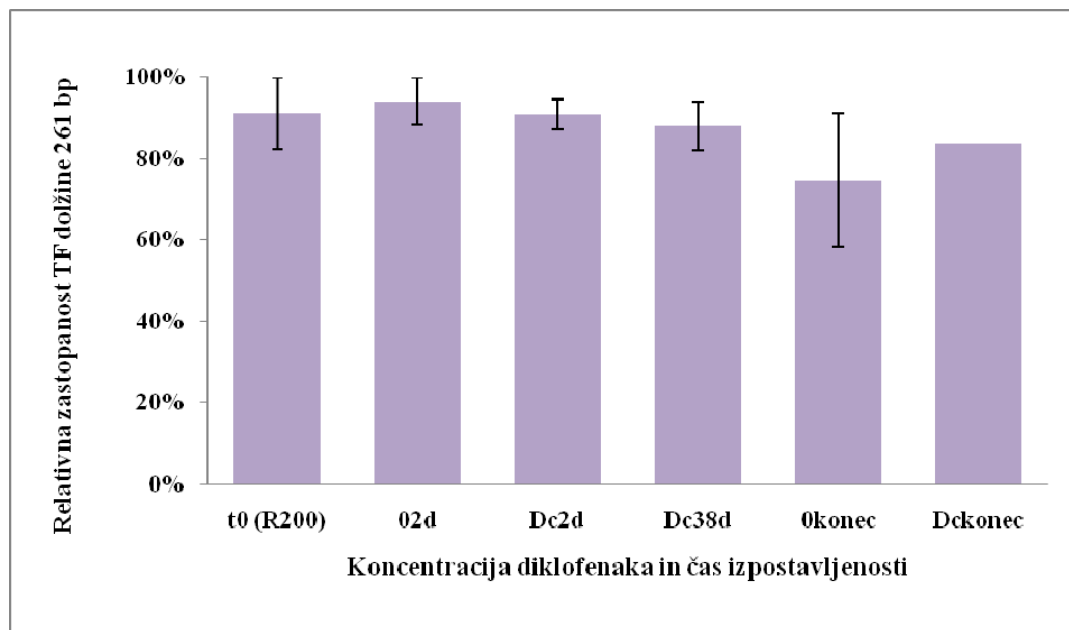


Priloga E: Dendrogram debela *Nitrospira* iz aktivnega blata bremenjenega z različnimi koncentracijami diklofenaka

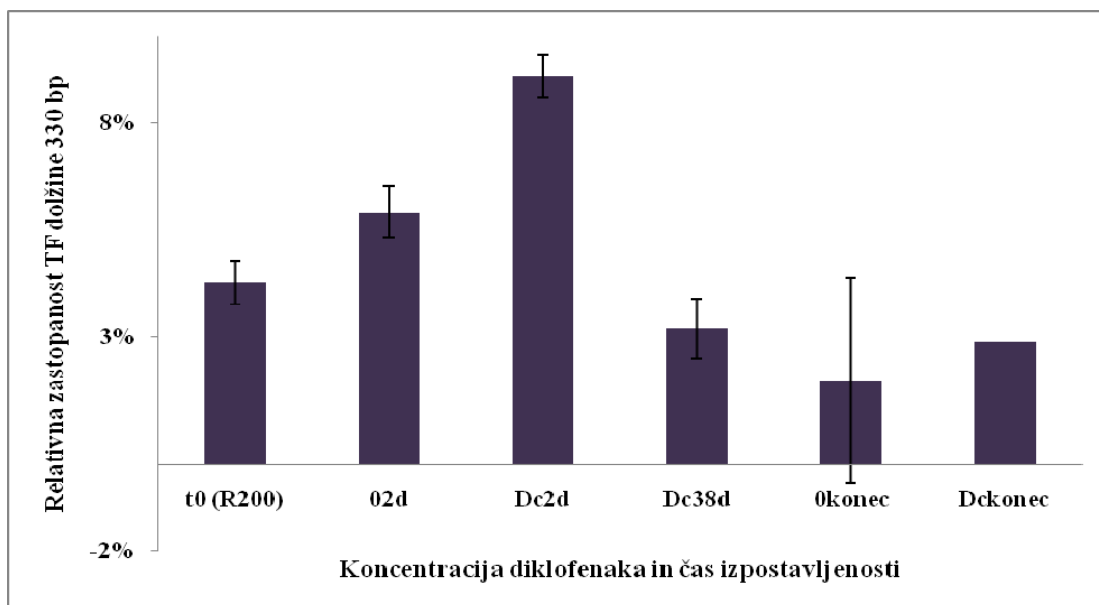


Priloga F: Vpliva diklofenaka na podskupino I (Slika a) in II (Slika b) *Nitrospira*. Prikazane so aritmetične sredine dveh ponovitev in standardni odkloni.

Slika a



Slika b



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra ZEME

**VPLIV FARMAKOLOŠKIH UČINKOVIN NA
STRUKTURO NITRIFIKACIJSKE ZDRUŽBE V
AKTIVNEM BLATU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011