

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maša BORŠTNAR VASLE

**PRIMERJALNA ANALIZA FEKALNE MIKROBIOTE  
ČRNEGA MOČERILA (*Proteus anguinus parkelj*) IN  
MEHIŠKEGA AKSOLOTLA (*Ambystoma mexicanum*)  
Z MOLEKULARNO BIOLOŠKIMI METODAMI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maša BORŠTNAR VASLE

**PRIMERJALNA ANALIZA FEKALNE MIKROBIOTE ČRNEGA  
MOČERILA (*Proteus anguinus parkelj*) IN MEHIŠKEGA  
AKSOLOTLA (*Ambystoma mexicanum*) Z MOLEKULARNO  
BIOLOŠKIMI METODAMI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMPARATIVE ANALYSIS OF FAECAL MICROBIOTA OF  
BLACK OLM (*Proteus anguinus parkelj*) AND MEXICAN AXOLOTL  
(*Ambystoma mexicanum*) WITH MOLECULAR BIOLOGICAL  
APPROACH**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2016

Borštnar Vasle M. Primerjalna analiza fekalne mikrobote črnega močerila...z molekularno biološkimi metodami.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2016

---

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

Za mentorja diplomskega dela je imenovan prof. dr. Gorazd Avguštin, za somentorico viš. predav. dr. Lijana Fanedl, za recenzentko pa doc. dr. Lilijana Bizjak Mali.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Somentorica: viš. predav. dr. Lijana Fanedl

Recenzentka: doc. dr. Lilijana Bizjak Mali

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: viš. predav. dr. Lijana FANEDL

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Lilijana BIZJAK MALI

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Maša Borštnar Vasle

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDC 579.26:597.92+597.97:577.2.088(043)=163.6
KG	mikrobne združbe/fekalna mikrobiota/črni močeril/ <i>Proteus anguinus parkelj</i> /mehiški aksolotl/ <i>Ambystoma mexicanum</i> /molekularno metode/klonske knjižnice/T-RFLP
AV	BORŠTNAR VASLE, Maša
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor)/ FANEDL, Lijana (somentorica)/ BIZJAK MALI, Lilijana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2016
IN	PRIMERJALNA ANALIZA FEKALNE MIKROBIOTE ČRNEGA MOČERILA ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ) IN MEHIŠKEGA AKSOLOTLA ( <i>Ambystoma mexicanum</i> ) Z MOLEKULARNO BIOLOŠKIMI METODAMI
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	X, 45 str., 10 sl., 7 pregl., 1 pril., 71 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Črni močeril ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ) je podvrsta človeške ribice, belokranjski endemit, ki sodi med največje poznane jamske vretenčarje, za katere je značilna neotenija in dolga življenska doba. V sklopu diplomske naloge smo žeeli spoznati fekalno mikrobioto črnega močerila. Za primerjavo smo v nalogu vključili fekalne vzorce mehiškega aksolotla ( <i>Ambystoma mexicanum</i> ), ki je dvoživka s podobnim življenskim slogom. Izolirali smo skupno mikrobnou DNK iz enega vzorca fecesa črnega močerila in enega vzorca fecesa aksolotla in pripravili klonski knjižnici bakterijskih genov za 16S rRNK. Iz pridobljenih sekvenč smo izrisali filogenetska drevesa in ugotovili, da se mikrobnii združbi obeh vrst med seboj razlikujeta. Pri črnem močerilu se je največ sekvenč uvrstilo v deblo <i>Proteobacteria</i> (39 %), sledijo sekvenči iz debla <i>Fusobacteria</i> (28 %), <i>Firmicutes</i> (20 %) in <i>Bacteroidetes</i> (13 %). Pri aksolotlu se je največ sekvenč uvrstilo v deblo <i>Bacteroidetes</i> (57 %), sledijo <i>Firmicutes</i> (31 %), <i>Verrucomicrobia</i> (10 %) in <i>Proteobacteria</i> (2 %). Fekalne vzorce obeh vrst, ki so bili odvzeti v različnih časovnih obdobjih, smo analizirali tudi z metodo T-RFLP. Vzorec črnega močerila in aksolotlov se tudi po tej analizi jasno ločijo med seboj, mikrobnia združba obeh osebkov se razlikuje. Dodatno preučen vzorec človeške ribice (navadnega močerila) se je uvrstil blizu (med) vzorce črnega močerila. Pri črnem močerilu smo lahko z analizo več vzorcev pokazali, da se mikrobnia združba spreminja skozi čas. Z analizo fekalnih vzorcev več aksolotlov pa smo pokazali, da se mikrobnia združba različnih osebkov aksolotlov razlikuje, a manj, kot se med seboj razlikuje združba v vzorcih istega črnega močerila, ki so bili odvzeti v različnih časovnih obdobjih.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn  
 DC UDK 579.26:597.92+597.97:577.2.088(043)=163.6  
 CX microbial community/faecal microbiota/black olm/*Proteus anguinus parkelj/mexican axolotl/Ambystoma mexicanum*/molecular biological approach/clone libraries/T-RFLP  
 AU BORŠTNAR VASLE, Maša  
 AA AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor)/ FANEDL, Lijana (co-advisor)/ BIZJAK MALI, Lilijana (reviewer)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
 PY 2016  
 TI COMPARATIVE ANALYSIS OF FAECAL MICROBIOTA OF BLACK OLM (*Proteus anguinus parkelj*) AND MEXICAN AXOLOTL (*Ambystoma mexicanum*) WITH MOLECULAR BIOLOGICAL APPROACH  
 DT Graduation Thesis (University studies)  
 NO X, 45 p., 10 fig., 7 tab., 1 ann., 71 ref.  
 LA sl  
 AL sl/en  
 AB Black olm (*Proteus anguinus parkelj*) is olm's subspecies, endemic to the south-eastern part of Slovenia, known as Bela krajina. Olms are the biggest known cave vertebrates, its features are neoteny and long life expectancy. In this graduation thesis we aimed to analyze the faecal microbiota of the black olm. Comparatively, we analyzed the fecal microbiota of the mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*), which is an amphibian with a similar life style. The total microbial DNA from one fecal sample of the black olm and one fecal sample of the axolotl was isolated. Clone libraries of 16S rRNA bacterial genes were prepared. The obtained sequences were used to create evolutionary trees, which showed that microbiota of both species is different. The majority of the sequences from black olm belong to the phylum *Proteobacteria* (39 %), following the phylum *Fusobacteria* (28 %), *Firmicutes* (20 %) and *Bacteroidetes* (13 %). The obtained sequences from axolotl belong to the phylum *Bacteroidetes* (57 %), following *Firmicutes* (31 %), *Verrucomicrobia* (10 %) and *Proteobacteria* (2 %). Several fecal samples, which were retrieved over time, were analyzed also with the molecular method T-RFLP. The fecal microbiota T-RFLP profiles from black olm and axolotl were again clearly different. The additionally analyzed sample of the »human fish« (the ordinary olm, *Proteus anguinus*) was more similar to the black olm samples. We could show that the fecal microbiota of the black olm is changing over time. In the case of the axolotl we could show, that fecal microbiota profiles of several individuals is somewhat different, however, the differences are smaller than in the case of samples from the single black olm, which were retrieved over time.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 KRATEK ZGODOVINSKI PREGLED OPISOV IN RAZISKAV ČLOVEŠKE RIBICE ALI MOČERILA.....	2
2.2 ČLOVEŠKA RIBICA ( <i>Proteus anguinus</i> ).....	2
2.2.1 Črni močeril ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ).....	3
2.2.2 Prebavni trakt človeške ribice .....	3
2.3 AKSOLOTL ( <i>Ambystoma mexicanum</i> ).....	5
2.3.1 Prebavni trakt aksolotla.....	5
2.4 POMEN BAKTERIJ V PREBAVNEM TRAKTU.....	6
2.5 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE PREBAVNEGA TRAKTA ŽIVALI .....	7
2.5.1 Tradicionalne mikrobiološke metode za preučevanje mikrobnih združb .....	7
2.5.2 Molekularne metode za preučevanje mikrobnih združb .....	7
2.5.2.1 Pridobivanje sekvenc iz okoljskih vzorcev .....	8
2.5.2.2 T-RFLP (polimorfizem dolžin končnih restrikcijskih fragmentov) .....	9
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>10</b>
3.1 MATERIALI .....	10
3.1.1 Vzorci.....	10
3.1.2 Kompleti .....	11
3.1.3 Raztopine in pufri.....	11
3.1.4 Gojišča .....	11
3.2 METODE.....	12
3.2.1 Osamitev skupne mikrobine DNK .....	12
3.2.2 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) .....	13
3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza .....	14
3.2.4 Priprava kompetentnih celice.....	14
3.2.5 Priprava klonske knjižnice .....	15
3.2.6 Sekvenciranje in filogenetska uvrstitev sekvenc.....	15
3.2.7 T-RFLP.....	16
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>18</b>

4.1 OSAMITEV SKUPNE MIKROBNE DNK IN PRIPRAVA KLONSKIH KNJIŽNIC GENOV ZA 16S rRNA .....	18
4.2 FILOGENETSKA ANALIZA .....	18
<b>4.2.1 Analiza fekalne mikrobiote črnega močerila – vzorec P16.....</b>	<b>18</b>
4.2.1.1 Analiza sekvenc iz debla <i>Proteobacteria</i> .....	21
4.2.1.2 Analiza sekvenc iz debla <i>Fusobacteria</i> .....	22
4.2.1.3 Analiza sekvenc iz debla <i>Firmicutes</i> .....	22
4.2.1.4 Analiza sekvenc iz debla <i>Bacteroidetes</i> .....	23
<b>4.2.2 Analiza fekalne mikrobiote aksolotla- vzorec A7 .....</b>	<b>23</b>
4.2.2.1 Analiza sekvenc iz debla <i>Bacteroidetes</i> .....	27
4.2.2.2 Analiza sekvenc iz debla <i>Firmicutes</i> .....	27
4.2.2.3 Analiza sekvenc iz debla <i>Verrucomicrobia</i> .....	27
4.2.2.4 Analiza sekvenc iz debla <i>Proteobacteria</i> .....	27
4.3 ANALIZA T-RFLP .....	28
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>31</b>
5.1 RAZPRAVA .....	31
<b>5.1.1 Proteobakterije .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1.2 Fusobakterije .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1.3 Firmikuti .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1.4 Bakteroidete .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1.5 Verukomikrobie .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1.6 Analiza profilov T-RFLP .....</b>	<b>35</b>
5.2 SKLEPI .....	37
<b>6 POVZETEK .....</b>	<b>38</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>39</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

**KAZALO SLIK**

<b>Slika 1:</b> Prerez telesa človeške ribice z vidnim prebavnim traktom (Configliachi in Rusconi, 1818: 119).....	4
<b>Slika 2:</b> Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse.....	18
<b>Slika 4:</b> Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc dela gena za 16S rRNA s 5' konca iz feca črnega močerila P16. ....	20
<b>Slika 5:</b> Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc dela gena za 16S rRNK s 3' konca iz feca črnega močerila P16. ....	21
<b>Slika 6:</b> Struktura bakterijske klonske knjižnice aksolotla A7. ....	24
<b>Slika 7:</b> Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc dela gena za 16 S rRNA s 5' konca iz feca aksolotla. ....	25
<b>Slika 8:</b> Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc dela gena za 16 S rRNA s 3' konca iz feca aksolotla. ....	26
<b>Slika 9:</b> Analiza glavnih koordinat PCoA profilov fekalne mikrobne združbe vzorcev črnega močerila (P16), treh osebkov aksolotlov (A5, A7 in A8) in človeške ribice (Po2011) odvzetih v različnih časovnih obdobjih. ....	29
<b>Slika 10:</b> Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe fekalnih vzorcev črnega močerila P16 človeške ribice Po2011 in aksolotlov A5, A7 in A8. ....	30

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Vzorci fecesa črnega močerila (P16), aksolotla (A) in človeške ribice (Po2011) uporabljeni v diplomski nalogi. ....	10
<b>Preglednica 2:</b> V diplomski nalogi uporabljeni začetni oligonukleotidi. ....	13
<b>Preglednica 3:</b> Osnovni protokol reakcije PCR za pomnoževanje gena za 16S rRNK .....	13
<b>Preglednica 4:</b> Protokol reakcije PCR za preverjanje prisotnosti ustreznih insertov v kloniranih plazmidnih vektorjih. ....	14
<b>Preglednica 5:</b> Protokol reakcije PCR za analizo z metodo T-RFLP. ....	16
<b>Preglednica 6:</b> Število sekvenc, ki smo jih pridobili iz fecesa črnega močerila P16.....	19
<b>Preglednica 7:</b> Število sekvenc, ki smo jih pridobili iz fecesa aksolotla. ....	23

Borštnar Vasle M. Primerjalna analiza fekalne mikrobote črnega močerila...z molekularno biološkimi metodami.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. študija mikrobiologije, 2016

---

## KAZALO PRILOG

PRILOGA A: T-RFLP - matrika distanc za vzorce črnega močerila, aksolotlov in človeške ribice.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

bp	bazni par
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid (angl. <i>cetyl trimethylammonium bromide</i> )
dATP	2'-deoksiadenozin-5'-trifosfat
dCTP	2'-deoksicitidin-5'-trifosfat
dGTP	2'-deoksigvanozin-5'-trifosfat
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid, DNA</i> )
dTTP	2'-deoxsitimidin-5'-trifosfat
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina (angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
LB	gojišče Luria-Bertani
MEGA	računalniški programa »Molecular Evolutionary Genetics Analysis«
PBS	fosfatni pufer (angl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
RDP II	spletni portal Ribosomal Database Project II
RNK	ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid, RNA</i> )
rRNK	ribosomska RNK (angl. <i>ribosomal RNA, rRNA</i> )
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Taq	oznaka polimeraze DNK bakterije <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T-RFLP	polimorfizem dolžin končnih restrikcijskih fragmentov (angl. <i>Terminal restriction fragment lenght polymorphism</i> )

## 1 UVOD

Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*) je podvrsta belega močerila oz. človeške ribice in je belokranjski endemit. Močerili so jamske živali, sposobne dolgotrajnega stradanja v neugodnih razmerah. Zanje je značilna tudi neotenija in dolga življenjska doba. Tako stradanje kot dolgoživost sta dejavnika, ki ju raziskovalci med drugim povezujejo tudi s črevesno mikrobioto. V zadnjih letih je bilo objavljenih veliko število raziskav o mikrobioti prebavnega trakta ljudi in živali, ter o njenem pomenu za gostitelja, mikrobiota prebavil močerila pa ostaja skoraj povsem neraziskana. Doslej je bila po našem vedenju z molekularnimi metodami opravljena le ena raziskava črevesne mikrobiote pri človeški ribici (*P. anguinus*) (Gramc, 2012). V raziskavi smo žeeli z molekularno biološkim pristopom (PCR, T-RFLP in sekvenciranje) ugotoviti, kakšna je pestrost in sestava mikrobiote v fekalnih vzorcih črnega močerila. Za primerjavo smo v nalogu vključili vzorce mehiškega aksolotla (*Ambystoma mexicanum*) (v nadaljevanju aksolotl), ki je dvoživka z do neke mere podobnim življenjskim slogom, ne sodi pa med jamske živali.

### 1.1 HIPOTEZE IN NAMEN DELA

V sklopu diplomske naloge smo žeeli spoznati fekalno mikrobioto črnega močerila in aksolotla. Dvoživke so zaščitene živali, uvrščene so na rdeči seznam ogroženih rastlinskih in živalskih vrst (Pravilnik..., 2002), zato je pridobivanje vzorcev iz vsebine prebavnega trakta oteženo. Na oddelku za biologijo Biotehniške fakultete v ujetništvu stalno gojijo nekaj močerilov in aksolotlov za raziskovalne potrebe. Te živali so primeren vir fekalnih vzorcev, ki jih lahko odvzamemo na neinvaziven način. Preučili smo primernost iztrebkov močerilov in aksolotlov za molekularno biološko analizo strukture fekalne mikrobiote, kar bi omogočilo nadaljnje raziskave brez žrtvovanja ujetih živali. Pri tem smo predpostavljali, da:

- se fekalna mikrobiota močerilov in aksolotlov razlikuje;
- je feces primeren kot vzorec za molekularno biološko analizo strukture fekalne mikrobiote;

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KRATEK ZGODOVINSKI PREGLED OPISOV IN RAZISKAV ČLOVEŠKE RIBICE ALI MOČERILA

Človeško ribico je prvi omenil Janez Vajkard Valvasor leta 1689 v Slavi vovodine Kranjske kot "zmajeve mladiče". Poimenoval in znanstveno opisal jo je Joseph Nicolaus Laurenti leta 1768. Poimenoval jo je *Proteus anguinus*. Beseda proteus izhaja od grškega boga Proteja - pastirja morskih živali, anguinus pa pomeni kačast, po obliki telesa. Leta 1772 jo je strokovno opisal tudi naravoslovec Ioannes Antoni Scopoli v delu *Observationes Zoologicae*, kjer jo je uvrstil med dvoživke. Objavljenih je bilo tudi veliko znanstvenih in strokovnih člankov, kot predmet raziskav in preučevanj pa so jih pošiljali po celi svetu (Bulog, 1994).

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

Človeška ribica je jamska repata dvoživka iz družine močerilarjev (*Proteidae*). Je edini jamski vretenčar v Evropi in endemit Dinarskega kraša. Zastopana je v podzemnih vodah od reke Soče v Italiji na severozahodu do reke Trebišnjice v Hercegovini (Sket, 1979). Poznanih je približno 250 nahajališč, od tega največ v Sloveniji.

Zanjo je značilna neotenija, kar pomeni, da se ne preobrazi in da spolno dozori na stopnji ličinke. Njen somatski razvoj je upočasnen, v primerjavi z gonadami, ki se razvijajo normalno hitro. Kot odrasla ohrani nekatere značilnosti ličink, kot so zunanje škrge, škržne reže in kožo z mnogimi larvalnimi znaki. Diha s škrsgami in delno tudi preko kože, ko je koncentracija kisika v vodi dovolj visoka. Če se koncentracija kisika zelo zniža, lahko uporabi tudi pljuča, kar ji omogoča dobro prilagoditev na zahtevne jamske razmere (Bulog, 1994).

Človeška ribica je plenilec in krovna vrsta podzemnega habitata v prehranski verigi. Njena hrana so raki in polži in v poletnem obdobju žuželke (Bulog, 1994). Na jamsko okolje z omejeno količino hrane se je prilagodila s počasno presnovo in zmanjšano aktivnostjo (Hervant in sod., 2001a), poleg tega je potreba po hrani sorazmerno majhna (Bulog, 2013). Ima nizke energijske zahteve, ter velike metabolne zaloge, kar ji omogoča preživetje med dolgimi obdobjji brez hrane (Hervant in sod., 2001b, Bizjak Mali in sod., 2013). Po prehranskem stresu zelo hitro okreva (Hervant in sod., 2001b). Brez hrane lahko preživi več let, v literaturi navajajo od 18 do 96 mesecev, brez vidnih znakov bolezni (Vandel, 1965; cit. po Bizjak Mali, 1995, Bulog in sod., 2000; Bizjak Mali in sod., 2013) ter tudi do 10 let (Bulog, 1994).

Kako poteka razmnoževanje v naravnem okolju ni poznano zaradi nedostopnosti habitata, ki ga naseljujejo. V laboratorijskih pogojih izleže do 70 jajc, iz katerih se po približno 140 dneh pri 10 °C izležejo ličinke. Po 115 dneh ličinka porabi zalogu rumenjaka v črevesni steni in se začne samostojno prehranjevati. Spolno dozori med 14 in 16 letom. Živi lahko vsaj 70 let (Bulog, 2013).

Zaradi kmetijskih dejavnosti, t.j. gnojenja in škropljenja s pesticidi, se je onesnaženost podzemlja zelo povečala, zaradi česar je ogroženo živalstvo in tudi človeška ribica, ki je še posebej občutljiva. Uvrščena je na seznam redkih in ogroženih vrst in na rdeči seznam ogroženih rastlinskih in živalskih vrst (Bulog, 2013).

### **2.2.1 Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*)**

Črni močeril ali *Proteus anguinus parkelj* (Sket in Arntzen, 1994) je podvrsta človeške ribice. Prva najdba sega v leto 1986, ko so ga odkrili v reki Dobličici pri Črnomlju. Je belokranjski endemit, saj ga najdemo izključno v okolici Črnomlja (Bulog, 2013), pri stalnih izvirih Dobličice in Jelševnika, ki se izlivata v reko Dobličico. Temperatura vode je med 10 °C in 11,3 °C in se med letnimi časi ne spreminja veliko. Izvira verjetno napajajo lokalne podzemne vode iz bližnjih gora ali voda iz podzemnega območja (Sket in Arntzen, 1994).

Črna podvrsta človeške ribice se od bele razlikuje predvsem po zunanjih značilnostih. Hrbtni in bočni del telesa črnega močerila sta črne barve z vijoličastim ali rjavkastim odtenkom. Okončine ima svetle s temnim vzorcem. Prsni del telesa je svetel z modrikastim ali rožnatim odtenkom. Ima tri pare kratkih, rdečih in razvezanih škrge (Sket in Arntzen, 1994). Njegova lobanja je kraša in s širšim gobcem kot pri beli podvrsti človeške ribice (Ivanović in sod., 2013). Oči so majhne, normalno razvite in prekrite z prozorno veznico. Pri beli podvrsti človeške ribice so oči prekrite s kožo in manjše od oči pri črnem močerilu (Bulog in sod., 2000). Zgradba zrkla črne podvrste je podobna dvoživkam, ki imajo dobro razvit vid. Trup je valjast s kratkim repom, ki pa je sorazmerno daljši kot pri beli podvrsti. V hrbtenici je tudi več vretenc. Ima kratke noge, s tremi prsti na sprednjih in dvema na zadnjih, ki so nekoliko kraša od sprednjih. Oba para nog pa sta kraša kot pri navadnem močerilu. Ima manj zob kot navadni močeril (Sket in Arntzen, 1994).

### **2.2.2 Prebavni trakt človeške ribice**

Prebavni trakt človeške ribice ima preprosto strukturo in je podobno grajen kot pri drugih repatcih (Bizjak Mali, 1995). Sestavlja ga ustna votlina, mišičast in kratek požiralnik, nekoliko razširjen želodec, ozek in rahlo naguban srednji (tanki) del črevesa, ki prehaja v debelo črevo, slednje se odpira v stok ali kloako (slika 1) (Noble, 1931).



**Slika 1: Prerez telesa človeške ribice z vidnim prebavnim traktom (Configliachi in Rusconi, 1818: 119)**

Hrane ne žveči, temveč jo pogoltne (Bulog, 1994). Hrana potuje po požiralniku, ki se razširi v želodec, ki je razdeljen na proksimalni del ali korpus in distalni del ali pilorus (Bizjak Mali, 1995, 1996). Prebava se začne v želodcu, kjer alveolarne žleze želodčne sluznice izločijo klorovodikovo kislino in encim pepsin, ki razgrajuje beljakovine (Bizjak Mali, 1995). Histološka zgradba želodca je relativno preprosta, žleze so alveolarne in grajene iz enega tipa celic, ti. oksintikopeptidne celice, ki proizvajajo tako klorovodikovo kislino kot tudi encime. Mišice v želodcu hrano potiskajo naprej in jo mešajo z želodčnimi sokovi. Želodec služi kemičnemu in fizičnemu spreminjanju hrane, prav tako tudi skladiščenju hrane. Želodcu sledi enostavno črevo, ki je razdeljeno na več odsekov, anteriorni, mediani in distalni del, ki se med seboj razlikujejo po oblikovanosti gub in zastopanosti mukoznih časastih celic (Bizjak Mali, 1995). Črevo je pri človeški ribici rahlo zavito, njegova dolžina je odvisna od velikosti osebka. Proizvodi razgradnje se absorbirajo preko stene črevesja, za učinkovitejšo absorbcijo poskrbijo črevesne resice in mikrovilarni epitel sluznice črevesa (Noble, 1931; Bizjak Mali, 1995). Posebnost zgradbe črevesa človeške ribice so celični skupki v lamini propriji sluznice, katerih vloga je proliferacija celic in obnova epitela (Bizjak Mali, 1995).

## 2.3 AKSOLOTL (*Ambystoma mexicanum*)

Aksolotl (*Ambystoma mexicanum*), je repata dvoživka iz družine prečnozobcev (Ambistomatidae). Ime aksolotl izhaja iz azteškega jezika in pomeni vodni pes, saj *axl* pomeni voda, *xolotl* pa pes (Clare, 2012). Njegovo telo je dokaj sploščeno, glava pa široka in sploščena z velikimi ustmi. Oči so brez vek, koža je tanka in gladka z veliko žlezami. Rep je zaokrožen in ob straneh stisnjen. Povprečna velikost je od 23 do 25 cm, dosežejo jo med 18 in 24 mesecem starosti. Pri tej starosti spolno dozorijo in so sposobni reprodukcije. Celo življenje živijo v vodi. Zanje je značilna neotenija, saj ne pride do preobrazbe kot pri večini ostalih dvoživk, ampak značilnost ličink obdržijo tudi v odrasli dobi. Na vsaki strani glave imajo 3 pare razvejanih zunanjih škrge. Kljub temu, da ostanejo v fazi ličinke, se jim razvijejo preprosta pljuča. Poleg škrge obdržijo tudi repno plavut, ki je značilna za ličinke dvoživk (Clare, 2012). Poleg dejstva, da ostanejo na stopnji ličinke, lahko pride tudi do metamorfoze. Preobrazbo lahko izzove izsušitev njegovega življenjskega prostora. V naravi živijo od 10 do 12 let. Mladi aksolotli so rastlinojedi, hranijo se z algami. Odrasli so plenilci in se hranijo z vodnimi nevretenčarji. Aksolotli so primarni plen ptičev, predvsem čapelj (Fryer, 2004).

Avtohtona populacija aksolotla je mikroendemična vrsta centralne Mehike. Njihovo število zelo upada v zadnjih desetletjih zaradi izgube življenjskega prostora (Contreras in sod., 2009). Prvotno je celotno Mehško centralno dolino zavzemala vrsta jezer in močvirij, kjer so se zadrževali populacije aksolotlov. S širitevijo mesta Mexico City vsepovod po dolini pa se je njihovo območje zmanjšalo na ostank v Xochimilco območju. Vendar se tudi na tem območju dogajajo aktivnosti, ki direktno vplivajo na kvaliteto vode jezera Xochimilco. Zaradi višjih temperatur vode so aksolotli bolj ranljivi za parazite, visoke koncentracije nitratov in amonija v vodi pa so za njih toksične. Zaradi majhnega števila osebkov v naravi, je mehiški aksolotl na IUCN (International Union for the Conservation of Nature) rdeči listi ogroženih živalskih vrst (Contreras in sod., 2009). Kot predmet raziskav jih gojijo v laboratorijih po celi svetu, poleg tega jih imajo ljudje kot hišne ljubljenčke (Clare, 2012).

Aksolotl je modelni organizem za raziskave fenomena regeneracije. Mnogo raziskovalcev je pritegnila tudi njihova sposobnost ponovne rasti tkiva in okončin v celoti (Clare, 2012). Repate dvoživke so edini vretenčarji, ki lahko celo življenje obnavljajo številne strukture, kot so njihove okončine, čeljust, rep, hrbtnača, koža (Roy in Lévesque, 2006). Rane lahko zacetijo brez nastanka brazgotin.

### 2.3.1 Prebavni trakt aksolotla

Aksolotl ima preprost prebavni trakt (Wonderly, 1963). Hrane ne žveči, ampak jo pogoltne celo (Clare, 2012). Hrana potuje po širokem požiralniku, ki je pri prečnozobcih daljši kot pri močerilarjih. Požiralnik se nadaljuje v želodec, vendar med njima ni jasne razmejitve.

Želodec je kot razširjena cev, ki ji sledi tanko črevo, ki je rahlo zavito in kratko. Debelo črevo je široko in se ga anatomsko zlahka loči od tankega črevesja. Črevo se odpira v stok ali kloako (Wonderly, 1963).

## 2.4 POMEN BAKTERIJ V PREBAVNEM TRAKTU

Glavna naloga prebavnega trakta je pretvorba hrane na manjše sestavne dele, ki jih gostitelj lahko prebavi in absorbira. V prebavnem traktu živijo različne vrste mikroorganizmov, ki tvorijo kompleksno mikrobno združbo. Poleg bakterij, ki so najbolj preučevane, najdemo tudi arheje, protozoje, glive in bakteriofage (Zoetendal in sod., 2004). Odnos med gostiteljem in mikroorganizmi je simbiotiski (Stevens in Hume, 1998).

Število in vrste mikroorganizmov se vzdolž prebavnega trakta razlikuje, na kar vpliva več faktorjev, med drugim pH, peristaltika, redoks potencial, prisotnost hranil in čas zadrževanja hrane (Hao in Lee, 2004). Tako je v želodcu zaradi nizkega pH in hitrega prehoda hrane število in pestrost mikrobnih vrst praviloma precej manjša, nato pa se postopoma povečuje, dokler ne doseže maksimuma v zadnjem delu prebavnega trakta (debelo črevo) (Stevens in Hume, 1998). Na prisotnost mikroorganizmov vplivajo tudi okoljske spremembe, kamor sodijo npr. spremembe v prehrani (Colombo in sod., 2015).

Bakterije naseljene v prebavnem traktu fermentirajo ogljikove hidrate v kratkoverižne maščobne kisline. S tem zagotavljajo energijo črevesnemu epiteliju in lajšajo absorpcijo natrija in vode. Poleg tega dušikove komponente pretvorijo v amoniak in beljakovine, ter sintetizirajo vitamine B (Stevens in Hume, 1998). Mikrobiota vpliva tudi na metabolizem in absorpcijo maščobnih kislin (Kostic in sod., 2013).

Poleg pretvorbe hrane, ima prebavni trakt živali tudi fiziološko in zaščitno funkcijo (Zoetendal in sod., 2004). Normalno prisotna mikrobiota z naselitvijo v dostopnih habitatih in proizvodnjo kratkoverižnih maščobnih kislin in bakteriocinov ustvari oviro za patogene mikroorganizme (Hao in Lee, 2004). Raziskave z gnoobiotskimi živalmi so pokazale, da mikroorganizmi v prebavnem traktu bistveno vplivajo na diferenciacijo epitelija prebavil, ter samo funkcijo prebavil (Bates in sod., 2006).

Značilnost odnosa med mikroorganizmom v prebavnem traktu in gostiteljem je zmožnost mikroorganizmov spremenjati metabolizem in uravnavati imunski odziv (Colombo in sod., 2015). Preučevanje prebavnega trakta je zaradi interakcij med celicami gostitelja, njegovo prehrano ter mikrobi, ki so tam naseljeni, zelo kompleksno. Poleg tega lahko uspešno gojimo le manjši del bakterij, zato je določanje nalog posameznih mikroorganizmov zelo težavno (Zoetendal in sod., 2004).

## 2.5 MIKROBIOLOŠKE RAZISKAVE PREBAVNEGA TRAKTA ŽIVALI

Mikrobno združbo v nekem vzorcu lahko preučujemo z različnimi metodami. Odločamo se lahko med t.i. tradicionalnimi in molekularnimi metodami. Vsaka metoda ima svoje prednosti in slabosti.

### 2.5.1 Tradicionalne mikrobiološke metode za preučevanje mikrobnih združb

Tradisionalne metode so metode gojenja, ki vključujejo izolacijo in opis mikroorganizmov. Pri klasičnem gojenju mikroorganizmov pripravimo trdno ali tekoče gojišče, ki vsebuje primeren vir ogljika, energije in elektronski akceptor. Ponavadi zrastejo hitro rastoče vrste, katere ne predstavljajo nujno dominantnih mikrobnih populacij v vzorcu (Hugenholtz, 2002).

Delež bakterij v prebavnem traktu, ki se jih da gojiti, je ocenjen na približno 10 % do 50 %. Razlogi za takšno neskladje med vsemi bakterijami prisotnimi v prebavnem traktu in gojenimi so: neznane rastne zahteve bakterij, selektivnost gojišč, ki jih uporabljam, stres, ki so mu podvržene bakterije v procesu osamitve, potreba po striktno anaerobnih razmerah in težavno posnemanje interakcij bakterij z drugimi mikroorganizmi v prebavnem traktu in z gostiteljevimi celicami (Zoetendal in sod., 2004). Danes se zaradi naštetih omejitev pri gojenju uporablja predvsem molekularne tehnike.

### 2.5.2 Molekularne metode za preučevanje mikrobnih združb

Velik del okoljskih bakterij še ni bilo gojenih v laboratoriju. Zato so glavni viri informacij teh negojenih mikroorganizmov njihove biomolekule, ki jih lahko preučujemo. Uporabimo lahko nukleinske kisline, lipide ali beljakovine. V zadnjih desetletjih je prišlo do velikega napredka in razvoja t.i. molekularnih metod (Rastogi in Sani, 2011).

Če se odločimo za metodo pri kateri bomo uporabili nukleinske kisline, imamo možnost izolacije celotnega genoma ali samo specifičnih genov, kot npr. genov za 16S rRNK, gyrB in drugih. Dandanes se za opis mikrobne združbe iz okoljskih vzorcev najpogosteje uporablja evolucijsko dobro ohranjeni gen za molekulo 16S rRNK (Rastogi in Sani, 2011). Prednosti gena za 16S rRNK so ubikvitarnost (prisotnost v vseh organizmih), strukturno in funkcionalno ohranjeni deli, ter variabilne in visoko ohranjene regije (Hugenholtz, 2002). Poleg tega so primerne velikosti (~1500 bp) in v celicah je veliko število ribosomov. Zaradi pogoste izbire tega gena v raziskavah je v prosto dostopnih podatkovnih zbirkah na voljo veliko število sekvenc za primerjalne analize (Rastogi in Sani, 2011).

Iz skupne mikrobne DNK, ki jo izoliramo iz okoljskih vzorcev, največkrat pomnožimo gen za 16S rRNK z reakcijo PCR (verižna reakcija s polimerazo). Tako pridobimo zadostno količino DNK za nadaljnje analize in imamo možnost zaznati tudi mikroorganizme, ki se v vzorcu prisotni v majhnem številu (von Wintzingerode in sod., 1997). Po končanem PCR

moramo pomnožke analizirati, vendar tega ne moremo storiti z običajno agarozno gelsko elektroforezo, ker so vsi pomnožki po velikosti enaki in je na agaroznem gelu vidna samo ena lisa (Kalle in sod., 2014). Zato za analizo pomnožkov PCR uporabimo različne metode. Lahko pripravimo klonske knjižnice, pri kateri pomnožke kloniramo v ustrezен vektor in jih nato sekvenciramo. V zadnjem času uporablajo novejše pristope, predvsem sekvenciranje naslednje generacije. S takšnim pristopom pridobiš več tisoč sekvenc iz enega vzorca (Rastogi in Sani, 2011), je pa cena takšnega pristopa ustrezeno visoka. Za analizo pomnožkov reakcije PCR se uporablajo tudi tipizacijske metode, med katere uvrščamo DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) in druge.

#### 2.5.2.1 Pridobivanje sekvenc iz okoljskih vzorcev

Prvi korak k uspešni izolaciji DNK je pravilno odvzemanje in shranjevanje vzorcev, da ne pride do prehitre lize celic in s tem izgube nukleinskih kislin. Naslednji pomemben korak je razbitje mikrobnih celic in sprostitev nukleinskih kislin (von Wintzingerode in sod., 1997). Liza celic iz fekalnih vzorcev lahko poteka mehansko, encimsko ali kemijsko (Salonen in sod., 2010). Če ne pride do sprostitev DNK iz vseh celic, bomo pri analizi rezultatov dobili popačene podatke o sestavi mikrobne združbe (von Wintzingerode in sod., 1997). Poleg uspešne lize mikrobnih celic v kompleksnem vzorcu kot je feces, je pomembna tudi izolacija kakovostne in čiste DNK (Li in sod., 2003). Vzorci fecesa namreč vsebujejo različne koncentracije inhibitornih molekul, kot so proteini, polisaharidni kompleksi, bilirubini in druge (Tang in sod., 2008). Le te se lahko izolirajo skupaj z DNK, zato je potrebno DNK očistiti in tako odstraniti nezaželjene molekule, da ne motijo nadaljnjih analiz (Li in sod., 2007).

Osamitvi DNK sledi pomnoževanje genov za 16S rRNK z reakcijo PCR (Kalle in sod., 2014). V reakciji lahko uporabimo t.i. univerzalne začetne oligonukleotide, ki imajo evolucijsko zelo ohranjeno zaporedje nukleotidov, kar omogoča uspešno pomnoževanje tega gena pri večini mikroorganizmov (Kanagawa, 2003). Kljub pogosti uporabi ima PCR tudi nekaj slabosti, na katere moramo biti pozorni. Lahko pride do nastanka heterodupleksov in himernih sekvenc. Takšni produkti lahko tvorijo velik delež končnega produkta (Kalle in sod., 2014). Nastanek heterodupleksov je bolj verjeten v zadnjih ciklih, saj je takrat večina začetnih oligonukleotidov porabljenih, koncentracija pomnožkov pa velika. Da se izognemu nastanku le teh, zmanjšamo število ciklov pri reakciji PCR (Kanagawa, 2003). Do nastanka himernih molekul vodi več mehanizmov, med drugim tudi nepopolno podvojevanje. Himerne sekvence povečajo število lažno pozitivnih sekvenc in s tem vplivajo na oceno pestrosti mikrobne združbe, ki jo preučujemo (Kalle in sod., 2014). Nastanek himernih sekvenc prav tako zmanjšamo z znižanjem števila ciklov pri reakciji PCR (Kanagawa, 2003), priporočljiva pa je tudi natančan analiza pridobljenih sekvenc z ustreznimi orodji. Da bi zmanjšali število napak pri reakciji PCR, moramo torej izbrati

primeren protokol, pozorno izbrati začetne oligonukleotide, polimerazo in ustrezne pufre ter pogoje reakcije PCR (Kalle in sod., 2014).

#### 2.5.2.2 T-RFLP (polimorfizem dolžin končnih restrikcijskih fragmentov)

V diplomski nalogi smo vzorce fecesa črnega močerila in aksolotla analizirali tudi z metodo T-RFLP. Metoda omogoča analizo strukture mikrobne združbe iz različnih vzorcev in preučevanje dinamike in sprememb v mikrobeni združbi kot odziv na spremembe v okolici (Osborn in sod., 2000). Metoda je sorazmerno poceni, robustna, dokaj ponovljiva in hitra (Prakash in sod., 2014).

Pred izvedbo metode moramo najprej izolirano DNK pomnožiti z reakcijo PCR. Za pomnoževanje uporabimo začetne oligonukleotide, ki so fluorescentno označeni. Pomnožke nato cepimo z restrikcijskimi endonukleazami, dobljene terminalne fragmente pa analiziramo z ustrezno elektroforetsko metodo, ki zazna samo fluorescentno označene terminalne fragmente. Rezultate analize obdelamo z ustreznimi računalniškimi programi (Kitts, 2001).

Na profile T-RFLP vpliva več dejavnikov. Pomembna je že začetna natančnost pri odvzemuh in pripravi vzorcev (Prakash in sod., 2014), saj lahko snovi, ki jih osamimo skupaj z DNK, motijo nadaljne postopke in končno analizo (Li in sod., 2007). Pred začetkom reakcije PCR moramo izbrati primerne začetne oligonukleotide, ki bodo pomnoževali željene dele skupne mikrobne DNK in bodo ustrezno fluorescentno označeni (Schütte in sod., 2008). Prakash in sodelavci (2014) so ugotavljali vpliv izbora restrikcijskih endonukleaz. Tiste endonukleaze, ki cepijo pogosteje, omogočajo nastanek večjega števila manjših fragmentov in s tem boljšo ločljivost vrhov. Ločljivost lahko izboljšamo tudi s sočasno uporabo več restrikcijskih endonukleaz (Dunbar in sod., 2001). Fragmente po cepitvi ločimo s kapilarno elektroforezo, kjer jakost fluorescence opredeli višino in površino vrha. Schutte in sodelavci (2008) so ugotovili, da moramo pri analizi neobdelanih podatkov najprej ločiti šum od signala. Nato poravnamo profile, saj prihaja do manjših razlik med velikostjo terminalnih fragmentov pri večkratnem nalaganju na kapilaro. Ugotovili so tudi, da pri analizi podatkov ni enotnih pristopov, od določanja praga detekcije, razvrščanja vrhov v kategorije, izbire mere podobnosti, izbire metode analize in predstavitev podobnosti ter povezave razlik združbe z razlikami v okolju (Schutte in sod., 2008).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci

Vzorce fecesov črnega močerila (z oznako P16) in aksolotlov (z oznakami A5, A7 in A8) smo dobili iz Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani, kjer živijo omenjene živali v ujetništvu. Vsak vzorec fecesa je bil označen z datumom odvzema iz akvarija. Vzorci so bili odvzeti s plastično pipeto, ki so ji odrezali konec ali z žličko, ki so ji preluknjali dno. Tako se je z vzorcem preneslo manj akvarijske vode. Nato so vzorec prestavili v sterilno mikrocentrifugirko in shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. Vzorec fecesa človeške ribice Po2011 smo dobili iz seminaravne Jame Tular. Vzorec smo uporabili le za primerjavo pri analizi T-RFLP, ker je bila fekalna analiza mikrobiote iz vzorca človeške ribice že narejena (Gramc, 2012). Seznam vzorcev, ki smo jih uporabili v diplomske nalogi je prikazan v preglednici 1.

Tako črni močerili kot tudi aksolotli imajo v akvariju deklorirano vodo iz vodovoda. Temperatura vode pri aksolotlih je med 15 °C in 17 °C, pri črem močerilu 11 °C. Črne močerile hranijo enkrat tedensko s postranicami (*Gammarus* sp.), aksolotle pa dvakrat tedensko z briketi za postrvi.

Hrano za postrvi sestavlja: ribja moka, pšenica, olupljena sončnična semena, ribje olje, repična pogača, ekstrahirane sojine tropine, hemoglobinska moka, sojin beljakovinski koncentrat, koruzni škrob, DL-metionin in monokalcijev fosfat. Dodani so vitamini A, D3 in E.

**Preglednica 1: Vzorci fecesa črnega močerila (P16), aksolotla (A) in človeške ribice (Po2011) uporabljeni v diplomske nalogi.**

Osebek	Datum vzorčenja	Osebek	Datum vzorčenja
P16	18.12.2009	Po2011	4.3.2011
P16 <sup>a</sup>	9.8.2010	A5	23.2.2011
P16	3.1.2011	A5	5.4.2011
P16	18.3.2011	A7	17.2.2011
P16	24.3.2011	A7 <sup>a</sup>	1.3.2011
P16	11.4.2011	A7	18.3.2011
P16	14.4.2011	A8	21.3.2011

<sup>a</sup> vzorca sta bila uporabljeni za klonsko knjižnico

### 3.1.2 Kompleti

- Komplet za čiščenje PCR pomnožkov: High Pure PCR Product Purification Kit (Roche diagnostics, ZDA)
- Komplet za čiščenje nukleinskih kislin iz agaroznega gela: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Nemčija)
- Komplet za kloniranje PCR pomnožkov: CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Litva)

### 3.1.3 Raztopine in pufri

Pufer TE, pH 8,0: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA, pH 8,0

Pufer PBS, pH 7,4: 137 mM NaCl, pH 7,4  
2,7 mM KCl, pH 7,4  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4  
1,76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

Pufer TBE 0,5×: 0,045 M Tris-borat  
0,001 M EDTA, pH 8,0

Raztopina CTAB/NaCl: 10 % (ut.) heksadeciltrimetil amonijev bromid  
0,7 M NaCl

### 3.1.4 Gojišča

Gojišče LB (Luria-Bertani):

- Kvasni ekstrakt: 5 g
- NaCl: 10 g
- Tripton: 10 g
- dH<sub>2</sub>O do 1000 ml

Soli smo raztopili v 1 l dH<sub>2</sub>O. Kadar smo pripravljali trdno gojišče, smo dodali še 15 g agarja v 1 l dH<sub>2</sub>O. Ko so se soli raztopile, smo gojišče avtoklavirali, ga ustrezno ohladili in sterilno dodali antibiotik ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml.

Gojišče LB *freezing buffer* (pH 7,5):

- Kvasni ekstrakt: 5 g
- Bacto tripton: 10 g

- NaCl: 10 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,8 g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 0,9 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 6,3 g
- C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>\*2H<sub>2</sub>O: 0,5 g (Na-citrat dihidrat)
- MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O: 1 g
- Glicerol: 44 ml
- dH<sub>2</sub>O do 1000 ml

Soli smo postopoma raztopili v 1000 ml dH<sub>2</sub>O. V svežo steklenico smo nato odmerili 956 ml raztopine in dodali 44 ml glicerola. Ko so se soli ob stelnem mešanju raztopile, smo gojišče avtoklavirali in sterilno dodali ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml.

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 Osamitev skupne mikrobne DNK

Vzorce smo najprej odtajali in jih stehtali. Nato smo jih resuspendirali v 1 ml pufra PBS (vortex) in jih centrifugirali 5 min pri 7000 x g. Supernatant smo odstranili in pelet še enkrat resuspendirali v 1 ml pufra PBS ter centrifugirali 5 min pri 7000 x g. Odstranili smo supernatant in pelet resuspendirali v 600 µl pufra PBS. Nato smo vzorce homogenizirali z ultrazvokom v sonikatorju Soniprep 150, ultrasonic disintegrator (ISTCP Inc., New Jersey, ZDA) in sicer s 3 cikli po 30 sekund. Vzorce močerila P16 smo sonicirali s 6 cikli po 30 sekund, da smo pridobili dovolj DNK. Homogenizat smo centrifugirali 10 min pri 12000 x g in supernatant prenesli v svežo mikrocentrifugirko. Dodali smo 100 µl 5M NaCl in premešali (vortex). Nato smo dodali še 80 µl 10-odstotnega CTAB v 0,7-odstotnem NaCl segretega pri 65 °C. Z obračanjem mikrocentrifugirke smo vsebino premešali in jo inkubirali 10 min pri 65 °C. Sledila je ekstrakcija v enakem volumnu kloroform. Po 10-minutnem centrifugiranju pri 12000 x g smo zgornjo, vodno fazo, prenesli v svežo mikrocentrifugirko in nukleinske kisline ekstrahirali z enakim volumnom mešanice fenol-kloroform-izoamilalkohol (25:24:1). Mešanico smo centrifugirali 10 minut pri 12000 x g in nato zgornjo, vodno fazo prenesli v svežo mikrocentrifugirko. Dodali smo 0,6-kratni volumen izopropanola in tako oborili v vodni fazi raztopljene nukleinske kisline. Po 15 minutni centrifugaciji pri 14000 x g smo odstranili supernatant, ter usedlino in stene mikrocentrifugirke sprali z 1 ml ledeno hladnega 70-odstotnega etanola. Sledilo je ponovno centrifugiranje 10 minut pri 14000 x g, zatem smo odstranili supernatant in usedlino posušili na zraku. Usedlino smo nato raztopili v 20 µl pufra TE in jo shranili pri -20 °C.

### 3.2.2 Pomnoževanje bakterijskih genov za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Pripravili smo reakcijske mešanice, ki so vsebovale 10-kratni pufer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM mešanico deoksinukleotidov (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), rekombinantno polimerazo DNK *Taq* (Fermentas, ZDA), začetna oligonukleotida, sterilno destilirano vodo (Sigma, ZDA) in 1 µl mikrobne DNK. Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili v diplomski nalogi so prikazani v preglednici 2. Pomnoževali smo v cikličnih termostatih MyCycler™ (Bio-Rad, ZDA) in Applied Biosystems Cycler po protokolih zapisanih v preglednicah 3, 4 in 5.

**Preglednica 2: V diplomski nalogi uporabljeni začetni oligonukleotidi.**

Začetni oligonukleotid	Sekvenca 5' – 3' začetnega oligonukleotida
Fd1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1401r	CGGTGTGTACAAGACCC
pJET 1.2f <sup>a</sup>	CGACTCACTATAAGGGAGAGCGGC
pJET1.2r <sup>b</sup>	AAGAACATCGATTTCATGGCAG

<sup>a</sup> pJET 1.2f – pJET 1.2 Forward Sequencing Primer (Fermentas MBI, Litva)

<sup>b</sup> pJET 1.2r – pJET 1.2 Reverse Sequencing Primer (Fermentas MBI, Litva)

**Preglednica 3: Osnovni protokol reakcije PCR za pomnoževanje gena za 16S rRNK.**

	T [°C]	Čas	Število ciklov	Začetna oligonukleotida
Začetna denaturacija	94	3 min	1	
Denaturacija	94	30 s		
Prileganje	56	30 s	30	fd1
Podaljševanje	72	1 min 40 s		1401r
Končno podaljševanje	72	20 min	1	
Hlajenje	4	∞		

**Preglednica 4: Protokol reakcije PCR za preverjanje prisotnosti ustreznih insertov v kloniranih plazmidnih vektorjih.**

	T [°C]	Čas	Število ciklov	Začetna oligonukleotida
<b>Začetna denaturacija</b>	94	10 min	1	
<b>Denaturacija</b>	94	45 s		
<b>Prileganje</b>	60	45 s	25	pJET1.2 forward
<b>Podaljševanje</b>	72	2 min		pJET1.2 reverse
<b>Končno podaljševanje</b>	72	15 min	1	
<b>Hlajenje</b>	4	∞		

### 3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabili za preverjanje uspešnosti izolacije genomske DNK, preverjanje upešnosti pomnoževanja in ustrezeno velikost pomnožkov. Pripravili smo 1-odstotne (ut. %) agarozne gele (Seakem® LE Agarose, Cambrex Bio Science Rochland Inc., ZDA) v ustrezeni količini 0,5-kratnega TBE pufra. Elektroforetsko ločevanje je potekalo 30 minut pri napetosti 5-10 V/cm v 0,5-kratnem TBE pufru. Po končani elektroforezi smo gele barvali v raztopini etidijevega bromida koncentracije 1 µg/ml. Sledilo je razbarvanje v destilirani vodi in pregled na transiluminatorju Gel Doc 1000 (BioRad, Hercule, ZDA). Slike smo obdelali s sistemom za zajemanje in obdelavo slik Molecular Analyst 1.4 (BioRad, Hercule, ZDA).

### 3.2.4 Priprava kompetentnih celice

Pri kloniranju smo uporabili kompetentne celice *Escherichia coli* sev TOP10. Pripravili smo jih po metodi s CaCl<sub>2</sub>. V tekoče gojišče LB z dodanim streptomycinom smo nacepili *E. coli* sev TOP10. Po prekonočni inkubaciji (~16h) v stresalniku pri 37 °C in frekvenci 225 stresljajev/minuto, smo 0,5 ml kulture prenesli v 50 ml svežega tekočega gojišča LB. Inkubirali smo ga pri 37 °C in frekvenci 300 stresljajev/minuto, dokler kultura ni dosegla absorbance pri 600 nm (OD<sub>600</sub>) 0,4 do 0,5. Nato smo kulturo prenesli v dve predhodno ohlajeni centrifugirki in ju 20 minut inkubirali na ledu. Po končani inkubaciji smo kulturo 10 minut centrifugirali pri 4 °C in 2300 x g. Supernatant smo odlili in s pipeto odstranili ostanke gojišča. Pelet smo previdno resuspendirali v 10 ml ledeno hladnega 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Resuspendiran pelet smo inkubirali 20 minut na ledu in nato ponovno 10 minut centrifugirali pri 4 °C pri 2300 x g. Supernatant smo odlili in s pipeto odstranili njegove ostanke ter pelet resuspendirali v 20 ml 15-odstotne (v/v) raztopine glicerola v 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. V predhodno ohlajene sterilne mikrocentrifugirke smo razdelili po 100 µl

pripravljenih kompetentnih celic. Hipno smo jih zamrznili v absolutnem etanolu ohlajenem pri -70 °C in jih pri taki temperaturi tudi hranili.

### 3.2.5 Priprava klonske knjižnice

Za pripravo klonske knjižnice smo potrebovali očiščene PCR pomnožke pravilnih velikosti. Z agarozno gelsko elektroforezo smo jih ločili, izrezali iz gela, ter jih s kompletom za izolacijo in čiščenje nukleinskih kislin iz agaroznega gela očistili po navodilih proizvajalca. Za kloniranje pomnožkov smo uporabili CloneJET™ PCR Cloning KIT. Najprej smo naredili encimsko mešanico, ki je vsebovala 10 µl 2-kratnega reakcijskega pufra, 6 µl očiščenega PCR produkta, 1 µl vode brez nukleaz in 1 µl encima (DNA blunting enzyme). Mešanico smo 5 minut inkubirali v termobloku pri 70 °C, nato smo pripravili ligacijsko mešanico. Encimski mešanici smo dodali 1 µl pJET 1,2/blunt cloning vektorja in 1 µl T4 DNK ligaze. Ligacijsko mešanico smo inkubirali pri sobni temperaturi (22 °C) 30 minut in jo nato prenesli na led. V svežo mikrocentrifugirko smo prenesli 5 µl ligacijske mešanice in dodali 50 µl že prej pripravljenih kompetentnih celic. Vse skupaj smo inkubirali 20 minut na ledu, nato je sledila izpostavitev celic topotnemu šoku in sicer pri 42 °C 50 sekund v vodni kopeli. Nato smo jih takoj prenesli na led za 3 minute. Dodali smo 200 µl tekočega gojišča LB, predhodno segretega pri 37 °C. Suspenzijo smo stresali 1 uro pri 37 °C in frekvenci 175 vrtljajev/minuto. Po končani inkubaciji smo transformirane celice razmazali na trda gojišča LB z dodanim ampicilinom (1 µl/ml) in jih preko noči inkubirali pri 37 °C. S sterilnimi zobotrebci smo pozitivne kolonije iz agarskih gojišč precepili na mikrotiterske plošče s tekočim LB *freezing* pufrom. Plošče smo ovili z navlaženim papirjem in jih preko noči inkubirali na 37 °C in stresali (60 vrtljajev/minuto). S t.i. 96 igličnim replikatorjem smo klone prenesli na agarsko gojišče z dodanim ampicilinom na ploščah OmniTray in jih po inkubaciji shranili pri 4 °C.

### 3.2.6 Sekvenciranje in filogenetska uvrstitev sekvenc

Plošče OmniTray s kloni smo poslali v podjetje Macrogen Inc. (Seul, Južna Koreja), kjer so po našem naročilu izvedli sekvenciranje s sekvencijskim začetnim oligonukleotidom T7 Promoter z metodo po Sangerju (1977). Pridobljene sekvence smo vnesli v program Codon Code Aligner 6.0.2 (CodonCode Corporation, 2015), ki je prostost dosten na spletu in izločili dele sekvenc, ki so vsebovale sekvenco vektorja. S programom BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) smo sekvence orientirali v isto smer in jih izvozili v formatu fasta. Sekvence smo pregledali s spletnima programoma Bellerophon (Huber in sod., 2004) in Chimera Check (RDP release 11) in izločili himerne sekvence. Primerjavo knjižnic črnega močerila in aksolotla smo naredili z orodjem Library compare spletnega servisa Ribosomal Database Project (RDP Release 11; Cole in sod., 2014). Filogenetsko umestitev sekvenc na nivoju debel smo najprej preverili na spletnem servisu RDP z orodjem RDP Classifier (Wang in sod., 2007). V filogenetsko analizo smo za vsako pridobljeno klonsko sekvenco vključili dve najbolj podobni, vendar nepodvojeni sekvenci iz baze SILVA (Pruesse in sod., 2012), kjer so sekvence poravnane z algoritmom SINA (Quast in sod., 2013). Izbrane sekvence

smo nato poravnali z orodjem ClustalW v programskemu paketu MEGA 6.0 (ang. Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura in sod., 2007). Filogenetska drevesa smo izrisali v programskemu paketu MEGA 6.0 na podlagi izračunanih distanc s Kimurinim dvoparametričnim modelom z metodo združevanja sosedov (ang. Neighbor-Joining) in jih statistično ovrednotili z metodo bootstrap (1000 ponovitev). Sekvencam iz baze je pripisana taksonomija projekta Silva. Za koreninjenje filogenetskih dreves smo uporabili arhejsko sekvenco *Methanocaldooccus jannaschii* (S001020555).

### 3.2.7 T-RFLP

Z verižno reakcijo s polimerazo smo najprej pomnožili željene odseke 16S rDNK. Program je prikazan v preglednici 5.

**Preglednica 5: Protokol reakcije PCR za analizo z metodo T-RFLP.**

	T [°C]	Čas	Število ciklov	Začetna oligonukleotida
<b>Začetna denaturacija</b>	95	3 min	1	
<b>Denaturacija</b>	95	30 s		
<b>Prileganje</b>	54	30 s	25	fd1-FAM
<b>Podaljševanje</b>	72	1 min 20 s		1401r
<b>Končno podaljševanje</b>	72	10 min	1	
<b>Hlajenje</b>	4	∞		

Pomnožke smo nato preverili na agaroznem gelu in jih očistili s kompletom High Pure PCR-Product Purification Kit po navodilih proizvajalca. Očiščenim pomnožkom smo izmerili koncentracijo in uspešnost čiščenja ponovno preverili na agaroznem gelu. Za cepitev pomnožkov PCR smo uporabili restriktijsko endonukleazo *MspI*. Na ledu smo pripravili 30 µl reakcijsko mešanico, ki je vsebovala 3 µl 10-krat koncentriranega ustreznega pufra, 1,5 µl restriktaze ter 25,5 µl pomnožkov PCR raztopljenih v elucijskem pufru. Cepitev je potekala čez noč (16 ur) v vodni kopeli pri 37 °C. Po končani cepitvi smo encim inaktivirali 20 min pri 80 °C in vzorce očistili s kompletom High pure PCR-Product Purification Kit po navodilih proizvajalca. Alikvote po 5 µl raztopljenih pomnožkov smo prenesli v mikrotitrsko ploščo in dodali 10 µl deioniziranega formamida in 0,5 µl internega standarda Genescan™ 500 ROX™ (Applied Biosystems, ZDA) za kapilarno elektroforezo. Vzorce smo 3-5 min denaturirali pri temeraturi 95 °C in jih ohladili na ledu. Vzorce smo analizirali s kapilarno elektroforezo ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, ZDA) in pridobljene podatke obdelali s programom Bionumerics 5.0 (Applied Maths, Belgija). Iz normaliziranih elektroferogramov smo za vsak par izračunali Pearsonov koeficient korelacije pri optimizaciji 0,1 %. Z metodo neutežene aritmetične sredine

(UPGMA) smo iz matrike podobnosti izrisali dendrogram, v katerem smo iskali gruče podobnih vzorcev (angl. Cluster analysis). Pearsonov koeficient korelacije elektroferogramov smo uporabili tudi pri primerjavi vzorcev s statistično metodo analize glavnih koordinat (PCoA - angl. Principal Coordinates Analysis). Metoda omogoča predstavitev podobnosti med vzorci v večdimensionalnem prostoru. Metodo PCoA smo opravili z bioinformacijskim programom za obdelavo podatkov Mothur v.1.36.1 (Schloss in sod., 2009) ter diagrame prvih dveh dimenzij izrisali z računalniškim programom Microsoft Excel.

## 4 REZULTATI

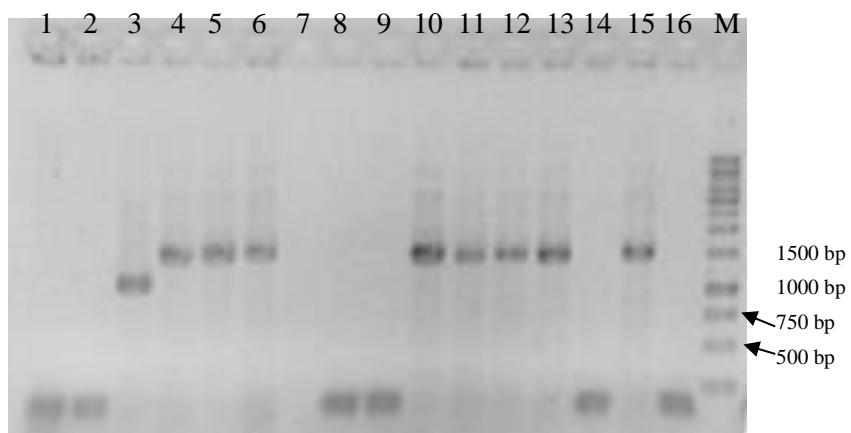
### 4.1 OSAMITEV SKUPNE MIKROBNE DNK IN PRIPRAVA KLONSKIH KNJIŽNIC GENOV ZA 16S rRNK

Za vpogled v mikrobno združbo prebavnega trakta črnega močerila in aksolotla smo pripravili dve klonski knjižnici genov za 16S rRNK. Skupno mikrobno DNA smo osamili iz vzorca fecesa črnega močerila P16, odvzetega 9.8.2010 in vzorca fecesa aksolotla A7, odvzetega 1.3.2011. Osamitev in kloniranje sta potekala po metodah opisanih v poglavjih 3.2.1 in 3.2.5.

### 4.2 FILOGENETSKA ANALIZA

#### 4.2.1 Analiza fekalne mikrobiote črnega močerila – vzorec P16

Po končanem kloniraju smo na agaroznem gelu preverili uspešnost pri naključno izbranih 15 klonih, vendar jih je le polovica vsebovala insert ustrezne velikosti. Zato smo postopek poskušali optimirati (koncentracija DNA), vendar je ponovno le polovica od 16 izbranih klonov vsebovala insert ustrezne velikosti, v nekaj primerih pa je bil produkt napačne velikosti (Slika 2). Zato smo predhodno preverili vseh 260 klonov in 96 pozitivnih klonov poslali sekvencirat.



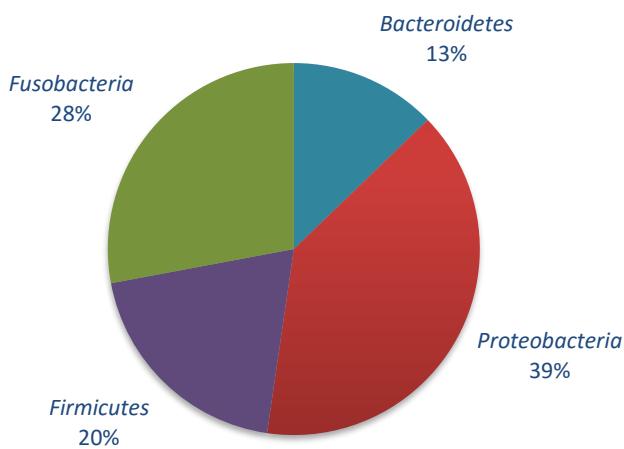
**Slika 2: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov reakcije PCR z začetnima oligonukleotidoma pJET1.2 forward in pJET1.2 reverse.** Pomnoževali smo klonirane inserte iz klonske knjižnice, pripravljene iz skupne mikrobne DNA izolirane iz vzorca P16, ki je bil izoliran 9.8.2010. M – velikostni standard 1kb 'GeneRuler™ 1kb DNA Ladder' (Fermentas); 1, 2, 3..., 15, 16 – zaporedne oznake klonov.

Dobljene sekvence smo obdelali po postopku opisanem v poglavju 3.2.6. Za nadaljnjo analizo je po odstranitvi vektorskih in himernih sekvenc ostalo 87 ustreznih sekvenc. Povprečna dolžina sevenc je bila 846 bp, najkrajša je bila dolga 521 bp, najdaljša pa 1056 bp. Število uporabnih in neuporabnih sekvenc iz knjižnice črnega močerila je prikazano v preglednici 6.

**Preglednica 6:** Število sekvenc, ki smo jih pridobili iz fecesa črnega močerila P16.

Št. klonov za sekvenciranje	Št. uporabnih sekvenc	Št. sekvenc z zapisom s 5' konca	Št. sekvenc z zapisom s 3' konca	Število neuporabnih sekvenc	
				Št. himernih sekvenc	Št. vektorskih sekvenc
96	87	57	30	3	6

Filogenetsko umestitev sekvenc iz črnega močerila smo najprej preverili s spletnim orodjem RDP Classifier (Wang in sod., 2007). RDP Classifier je sekvence uvrstil v štiri bakterijska debla (slika 3). Tri (*Firmicutes*, *Bacteroidetes* in *Proteobacteria*) običajno predstavljajo dominantna debla v prebavnem traktu živali, četrto deblo, t.j. *Fusobacteria* pa je novejše deblo, ki je slabše poznano, predvsem z vidika njegove ekološke razširjenosti.



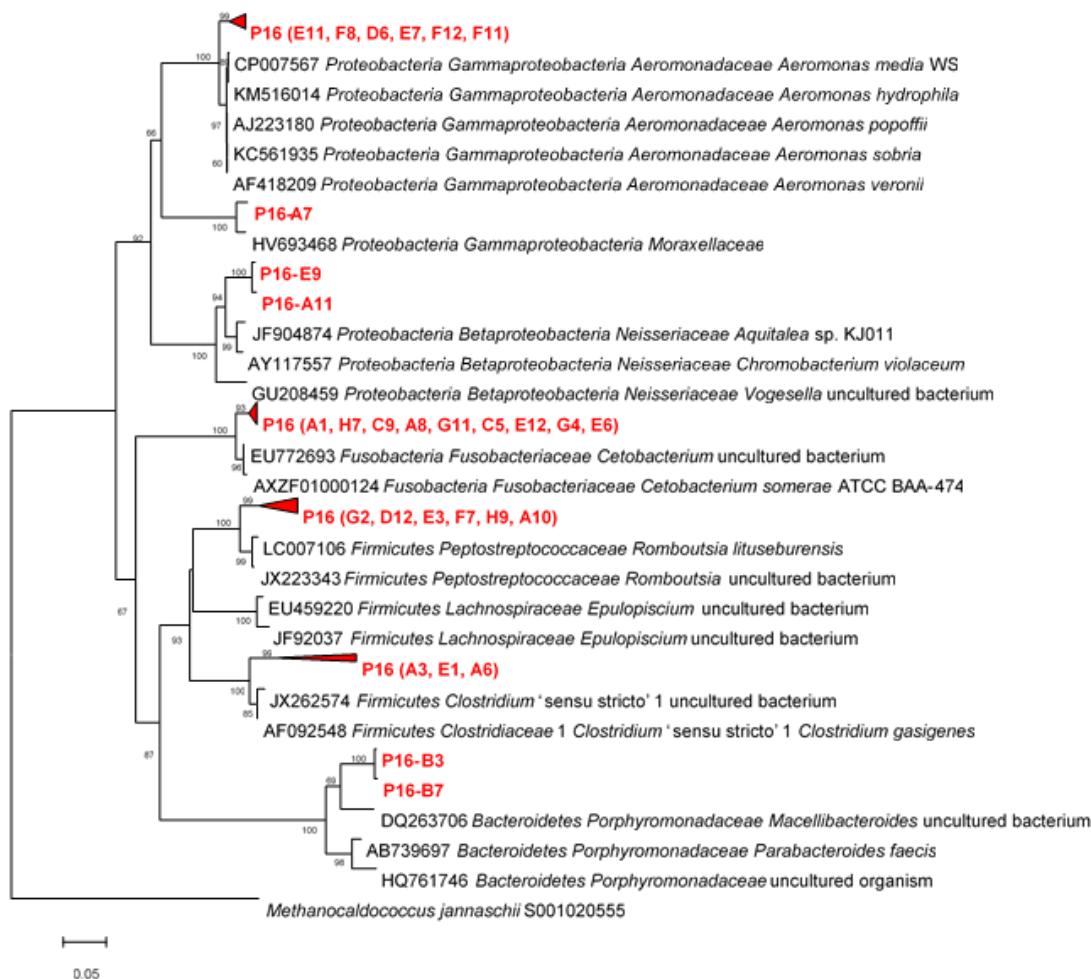
**Slika 3:** Struktura bakterijske klonske knjižnice črnega močerila P16.

Med sekvencami je bilo 30 sevenc z zapisom s 3' konca. Ker se sekvence s 3' konca (usmerjene obratno, angl. reverse) s sekvencami iz 5' konca niso prekrivale v dovolj velikem obsegu, da bi lahko izračunali distančno matriko, smo zato izrisali dve ločeni

filogenetski drevesi. Sliki 4 in 5 prikazujeta filogenetski drevesi s sekvencami klonov genov za 16S rRNA črnega močerila z dodanima dvema najbolj podobnima sekvencama iz baze Silva (Pruesse in sod., 2012). Sekvencam iz baze je pripisana taksonomija projekta Silva.



**Slika 4: Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc dela gena za 16S rRNA s 5' konca iz fecesa črnega močerila P16.** V analizo so vključene skupaj z dvema najbolj podobnima sekvencama vsake sekvence iz baze Silva. Evolucijske razdalje smo izračunali s Kimurinim 2-parametričnim modelom in drevo izrisali z metodo največjega verjetja (Neighbour-Joining) v programu MEGA6. Na vejiščih so predstavljene vrednosti podpore (Bootstrap) s 1000 ponovitvami. Kot zunanjо skupino smo uporabili arhejo *Methanocaldococcus jannaschii* (S001020555). Merilo predstavlja število substitucij na nukleotidno mesto. P16- oznaka za klonske sekvence črnega močerila (rdeče obarvano). Oznake A2, A4,....H8, H10 so oznake klonov.



**Slika 5: Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenč dela gena za 16S rRNA s 3' konca iz fecesa črnega močerila P16.** V analizo so vključene skupaj z dvema najbolj podobnima sekvencama vsake sekvenče iz baze Silva. Evolucijske razdalje smo izračunali s Kimurinim 2-parametričnim modelom in drevo izrisali z metodo največjega verjetja (Neighbour-Joining) v programu MEGA6. Na vejiščih so predstavljene vrednosti podpore (Bootstrap) s 1000 ponovitvami. Kot zunanjou skupino smo uporabili arhejo *Methanocaldococcus jannaschii* (S001020555). Merilo predstavlja število substitucij na nukleotidno mesto. P16- oznaka za klonske sekvenče črnega močerila (rdeče obarvano). Oznake A2, A4,...,H8, H10 so oznake klonov.

#### 4.2.1.1 Analiza sekvenč iz debla *Proteobacteria*

V deblo *Proteobacteria* se je uvrstilo 39 % sekvenč, kar je 34 sekvenč iz celotne knjižnice črnega močerila. Tvorijo eno večjo in dve manjši filogenetski skupini. Večina sekvenč se je uvrstila v razred *Gammaproteobacteria*, v družino *Aeromonadaceae*. Okoljske sekvenče iz baz podatkov RDP in BLAST, ki so podobne sekvencam knjižnice iz črnega močerila, so bile izolirane iz vodnih okolij (rečnega sedimenta, izvira vode, močvirja in vode v

ribniku, kjer so bile prisotne bolne ribe), fecesa velike pande ter iz gvana netopirja, od koder so izolirali bakterijo *Aeromonas hydrophila* sev RCB 53. Podobne okoljske sekvene so bile izolirane tudi iz vsebine prebavnega trakta rib: srebrni tolstolobik (*Hypophthalmichthys molitrix*), rdečeoke (*Rutilus rutilus*) in navadne cebrice (*Danio rerio*). Iz vsebine prebavnega takta soma (*Ictalurus punctatus*) so izolirali bakterijo *Aeromonas media* sev 2CCH203, iz tilapije (*Oreochromis niloticus*) pa bakterijo *Aeromonas veroni* sev NK06. Podobne okoljske sekvene so izolirali še iz prebavnega trakta morskega raka, deževnika in ličinke komarja.

Tri sekvene so se uvrstile v razred *Betaproteobacteria*, v družino *Neisseriaceae*. Sekvene iz baz podatkov RDP in BLAST, ki so podobne sekvcencam iz knjižnice črnega močerila, so bile izolirane iz vsebine prebavnega takta hrošča, kože dvoživke, iz rečne vode, ter iz prebavnega trakta miši, katerih prebavni trakt so kolonizirali z mikrobioto prebavnega trakta ribe navadna cebrica (*Danio rerio*).

Samo ena sekvenca se je umestila v razred *Gammaproteobacteria*, v družino *Moraxellaceae*.

#### 4.2.1.2 Analiza sekvcenc iz debla *Fusobacteria*

V deblo *Fusobacteria* se je uvrstilo 28 % sekven, kar je 24 sekven iz celotne knjižnice. Vse tvorijo eno samo filogenetsko skupino znotraj družine *Fusobacteriaceae*. Podobne okoljske sekvene iz baz podatkov RDP in BLAST so izolirali iz fecesa polarnega medveda, postrvi in gozdnega psa (*Speothos venaticus*), iz vsebine prebavnega trakta rib: baramundi (*Lates calcarifer*), navadne cebrice (*Danio rerio*) in soma (*Pelteobagrus fulvidraco*). Podobne okoljske sekvene so pridobili še iz prebavnega trakta miši, katerih prebavni trakt so kolonizirali z mikrobioto prebavnega trakta ribe navadna cebrica (*Danio rerio*), želodca soma (*Pelteobagrus fulvidraco*) in iz vodnega izvira. V to skupino so se uvrstile še sekvene bakterij *Cetobacterium somerae*, ki so jih pridobili iz fecesa človeka (sev WAL 14325) in ribe *Siganus canaliculatus* (sev 23).

#### 4.2.1.3 Analiza sekvcenc iz debla *Firmicutes*

V deblo *Firmicutes* se je uvrstilo 18 sekven oziroma 20 % vseh sekven. Razvrstile so se v tri filogenetske skupine. Veliko skupino tvorijo sekvene, ki so podobne bakterijam iz družine *Peptostreptococcaceae*. Okoljske sekvene iz baz podatkov RDP in BLAST, podobne tej skupini sekven, so izolirali iz vsebine prebavnega trakta soma in podgane, ter iz fecesa piščanca, delfina, žirafe in človeka.

Sedem sekven se je uvrstilo v družino *Clostridiaceae 1*. Okoljske sekvene podobne sekvcencam knjižnice črnega močerila so pridobili iz sedimenta v Baltskem morju, vsebine prebavnega trakta deževnika, šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) in krpa (*Cyprinus carpio*),

ter fecesa velikega pande. V to skupino se je uvrstila tudi sekvenca bakterije *Clostridium gasigenes* sev R26, kot kvarljivec vakuumsko pakiranega mesa.

Ena sekvenca se je uvrstila v družino *Lachnospiraceae*. Okolske sekvence so izolirali iz fecesa otrok in velikega pande.

#### 4.2.1.4 Analiza sekvenc iz debla *Bacteroidetes*

V deblo *Bacteroidetes* se je uvrstilo 11 sekvenca oziroma 13 %. Vse sekvence tvorijo eno filogenetsko skupino. Sekvence so podobne bakterijam iz družine *Porphyromonadaceae*. Okolske sekvence so bile pridobljene iz epidermalne sluzi atlantske polenovke (*Gadus morhua*), biofilma v vodi, ter iz vsebine prebavnega trakta navadne cebrice (*Danio rerio*), krapi (*Cyprinus carpio*), ribe *Coryphaenoides yaquinae* iz globine 5800 m in človeka.

#### 4.2.2 Analiza fekalne mikrobiote aksolotla - vzorec A7

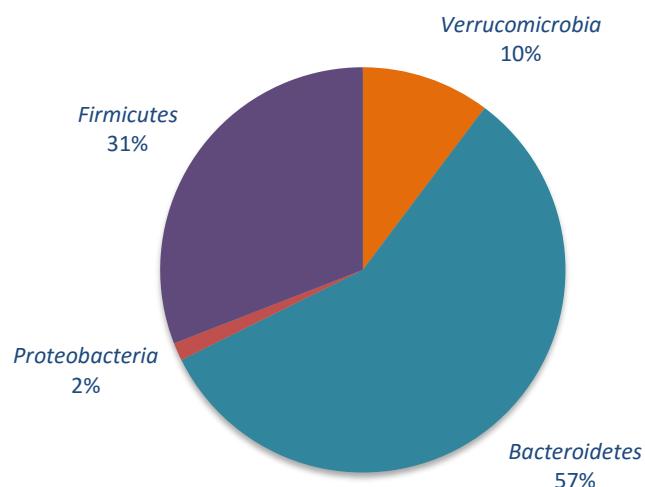
Uspešnost kloniranja smo preverili na agaroznem gelu. Preverili smo 15 naključno izbranih klonov, od tega jih je 13 vsebovalo inserte ustrezne velikosti. Sekvencirat smo poslali 96 klonov. Dobljene sekvence smo obdelali po postopku opisanem v poglavju 3.2.6. Za nadaljnjo analizo je ostalo 75 ustreznih sekvenca.

V preglednici 7 je prikazano število sekvenca, ki smo jih uspešno uporabili za analizo s spletnim orodjem RDP in število sekvenca z zapisom s 3' konca. Povprečna dolžina sekvenca je bila 521 bp.

**Preglednica 7: Število sekvenca, ki smo jih pridobili iz fecesa aksolotla.**

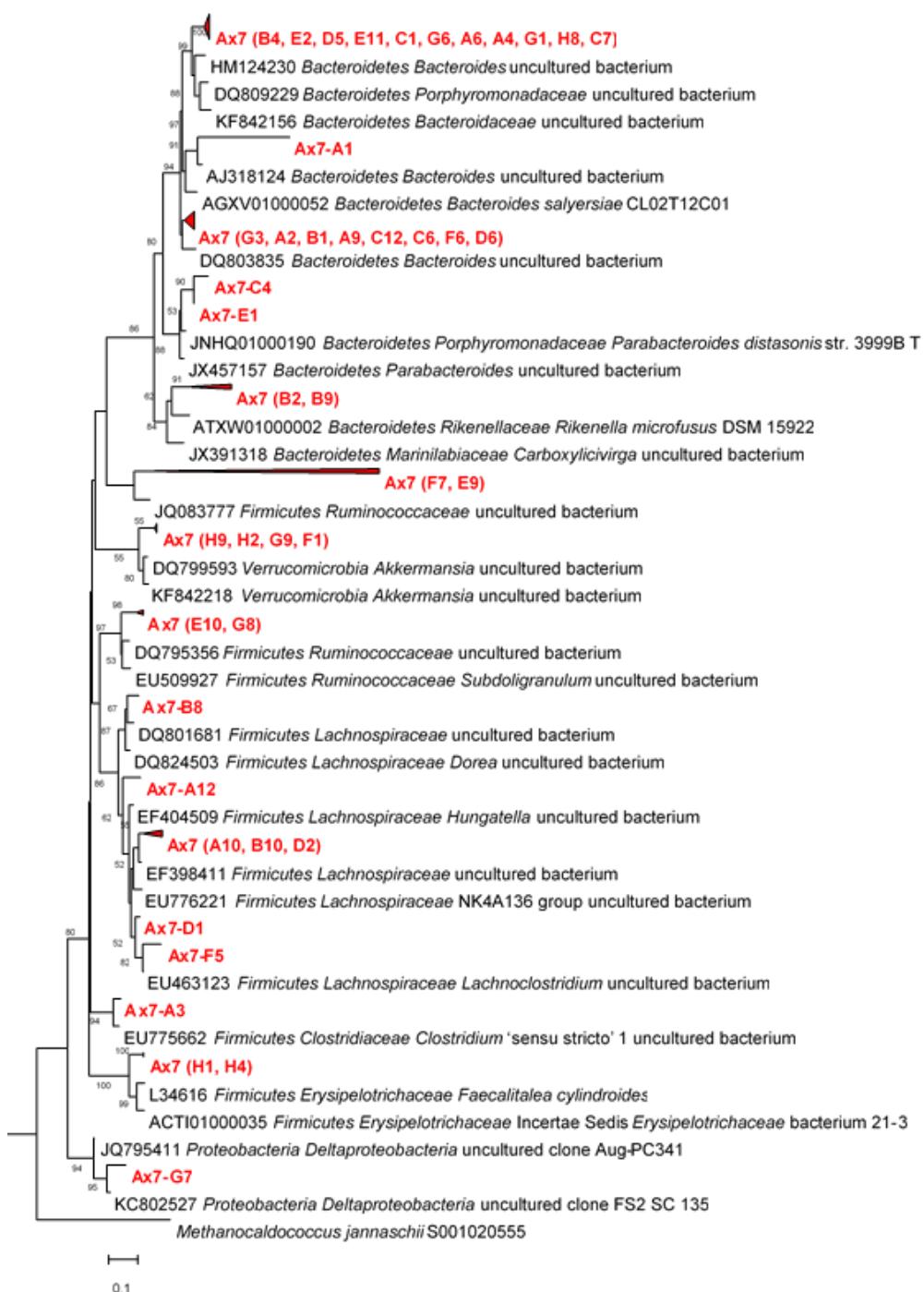
Št. klonov za sekvenciranje	Št. uporabnih sekvenca	Št. sekvenca z zapisom s 5' konca	Št. sekvenca z zapisom s 3' konca	Število neuporabnih sekvenca			
				Št. himernih sekvenca	Št. vektorskih sekvenca	Brez sekvence	Slaba kakovost sekvenca
96	75	54	21	1	13	2	5

Filogenetsko umestitev sekvenca smo preverili s spletnim orodjem RDP Classifier (Wang in sod., 2007), ki je vse sekvence uvrstil v štiri debla (*Bacteroidetes*, *Firmicutes Verrucomicrobia* in *Proteobacteria*) (slika 6). Vsa debla so prisotna v prebavnem traktu živali.



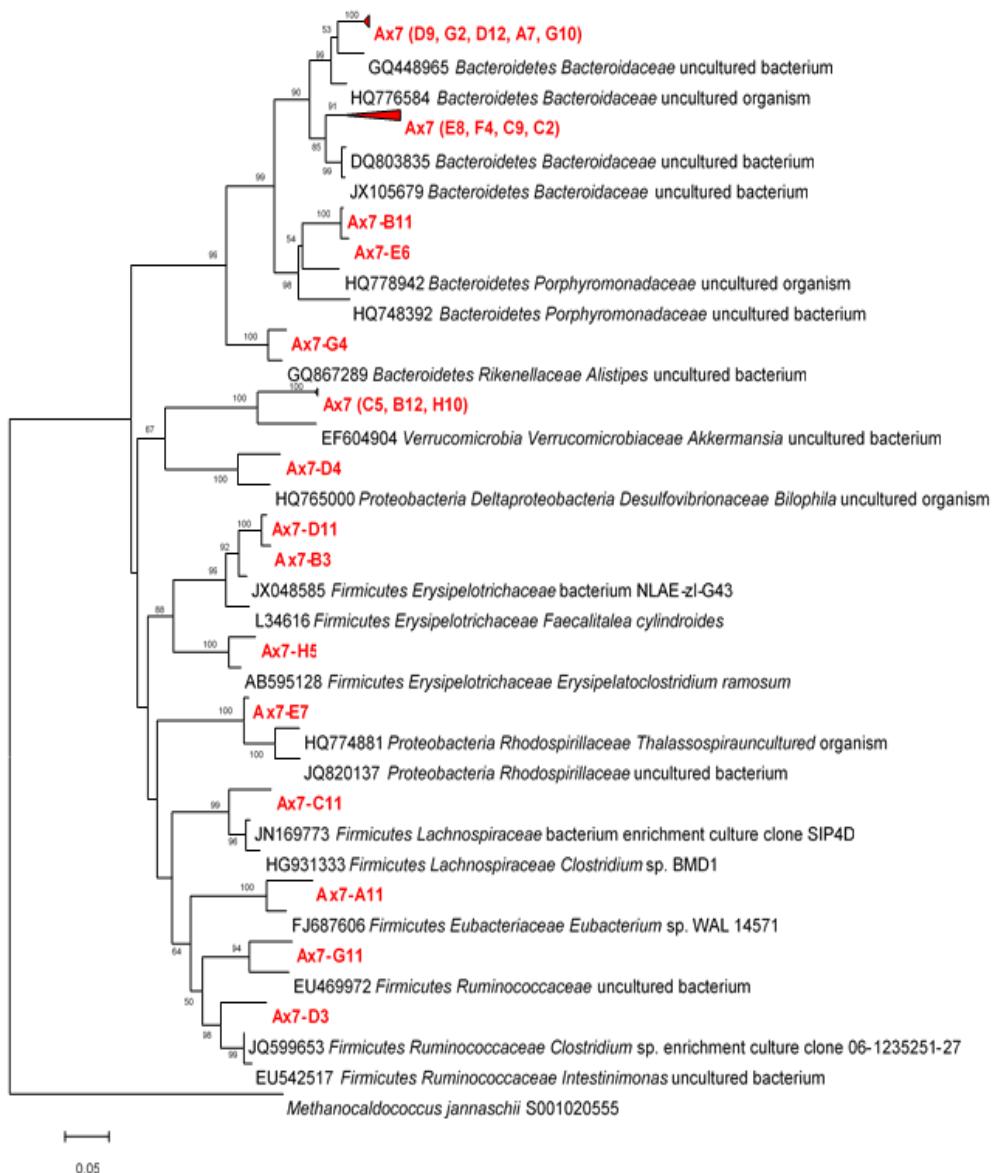
Slika 6: Struktura bakterijske klonske knjižnice aksolotla A7.

Za nadaljnjo filogenetsko analizo smo uporabili ožji izbor sekvenc. Izključili smo sekvene, ki so bile krajše od 200 bp. Vsaki klonski sekveni smo dodali dve najbolj podobni sekveni iz baze Silva (Pruesse in sod., 2012) in izrisali filogenetsko drevo sekvene knjižnice aksolotla (Slika 7). Sekvenc z zapisom s 3' konca je bilo 31, z njimi smo izrisali drugo filogenetsko drevo (Slika 8). Sekvencam iz baze je pripisana taksonomija projekta Silva.



**Slika 7: Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc dela gena za 16 S rRNA s 5' konca iz fecesa aksolotla.**

V analizo so vključene skupaj z dvema najbolj podobnima sekvencama vsake sekvence iz baze Silva. Evolucijske razdalje smo izračunali s Kimurinim 2-parametričnim modelom in drevo izrisali z metodo največjega verjetja (Neighbour-Joining) v programu MEGA6. Na vejih so predstavljene vrednosti podpore (Bootstrap) s 1000 ponovitvami. Kot zunanjega skupina smo uporabili arhejo *Methanocaldococcus jannaschii* (S001020555). Merilo predstavlja število substitucij na nukleotidno mesto. Ax7- označuje klonske sekvence aksolotla, ki je v diplomski nalogi označen kot A7, tukaj pa smo ga preimenovali v Ax7 (označeno rdeče), da se loči od klona A7. Oznake A1, A2,...,H8, H9 so označene klonov.



**Slika 8: Filogenetsko drevo bakterijskih sekvenc dela gena za 16 S rRNA s 3' konca iz fecesa aksolotla.** V analizo so vključene skupaj z dvema najbolj podobnima sekvencama vsake sekvence iz baze SINA. Evolucijske razdalje smo izračunali s Kimurinim 2-parametričnim modelom in drevo izrisali z metodo največjega verjetja (Neighbour-Joining) v programu MEGA6. Na vejiščih so predstavljene vrednosti podpore (Bootstrap) s 1000 ponovitvami. Kot zunanjjo skupino smo uporabili arhejo *Methanocaldococcus jannaschii* (S001020555). Merilo predstavlja število substitucij na nukleotidno mesto. Ax7- oznaka klonske sekvence aksolotla, ki je v diplomski nalogi označen kot A7, tukaj pa smo ga preimenovali v Ax7, da se loči od klonov A7. Oznake A7, A11,.....H5, H10 so oznake klonov.

#### 4.2.2.1 Analiza sekvenc iz debla *Bacteroidetes*

V deblo *Bacteroidetes* se je uvrstilo 40 sekvenc oziroma 57 %. Večina sekvenc se je razvrstila v dve večji skupini. V prvo večjo filogenetsko skupino tega debla so se uvrstile sekvence podobne sekvencam bakterij iz rodu *Bacteroides* in v drugo skupino iz družine *Bacteroidaceae*. V to deblo sta se uvrstili še dve manjši skupini. Štiri sekvence so se uvrstile v družino *Porphyromonadaceae*. Tri sekvence pa v družino *Rikenellaceae*. Okoljske sekvence podobne sekvencam iz knjižnice aksolotla so izolirali iz vsebine prebavnega trakta termitov, miši, purana, krapa, tjljuna in odraslega človeka, iz vampa krav, biofilma v ustih človeka ter iz fecesa miši, teličkov, prašičev in otrok.

#### 4.2.2.2 Analiza sekvenc iz debla *Firmicutes*

V deblo *Firmicutes* se je uvrstilo 31 % sekvenc, kar pomeni 23 sekvenc iz celotne aksolotlove knjižnice. Sekvence tvorijo pet filogenetskih skupin. Veliko skupino znotraj tega debla tvorijo sekvence, ki so podobne sekvencam bakterij iz družine *Lachnospiraceae*. Šest sekvenc je podobnih sekvencam bakterij iz družine *Ruminococcaceae*. Družini *Erysipelotrihaceae* je pripadlo pet sekvenc. Le ena sekvencia se je uvrstila v skupino iz družine *Clostridiaceae*, ter ena v družino *Eubacteriaceae*. Okoljske sekvence so po primerjavi sekvenc iz baze RDP pridobili iz fecesa miši, gazele, tajskega goveda in človeka, ter iz vsebine prebavnega trakta miši in prašiča.

#### 4.2.2.3 Analiza sekvenc iz debla *Verrucomicrobia*

V deblo *Verrucomicrobia* se je uvrstilo 7 sekvenc, kar predstavlja 10 % vseh sekvenc iz te knjižnice. Vse sekvence tvorijo eno filogenetsko skupino in so podobne bakterijam iz družine *Verrucomicrobiaceae*. Okoljske sekvence podobne sekvencam iz aksolotlove knjižnice so po primerjavi z RDP in BLAST pridobili iz fecesa opice, morskega sesalca (*Dugong dugon*), iz fecesa človeka, od koder so izolirali bakterijo *Akkermansia muciniphila* sev GP28, ter iz vsebine prebavnega trakta miši, ribe *Siganus canaliculatus* in človeka.

#### 4.2.2.4 Analiza sekvenc iz debla *Proteobacteria*

V deblo *Proteobacteria* so se uvrstile tri sekvence (2 %). V filogenetsko drevo smo vključili le dve sekvenci, saj je bila ena prekratka za analizo. V razred *Alphaproteobacteria* se je uvrstila samo ena sekvanca. Druga se je uvrstila v razred *Delta proteobacteria*. Podobne okoljske sekvence so izolirali iz fecesa človeka in vsebine prebavnega trakta miši.

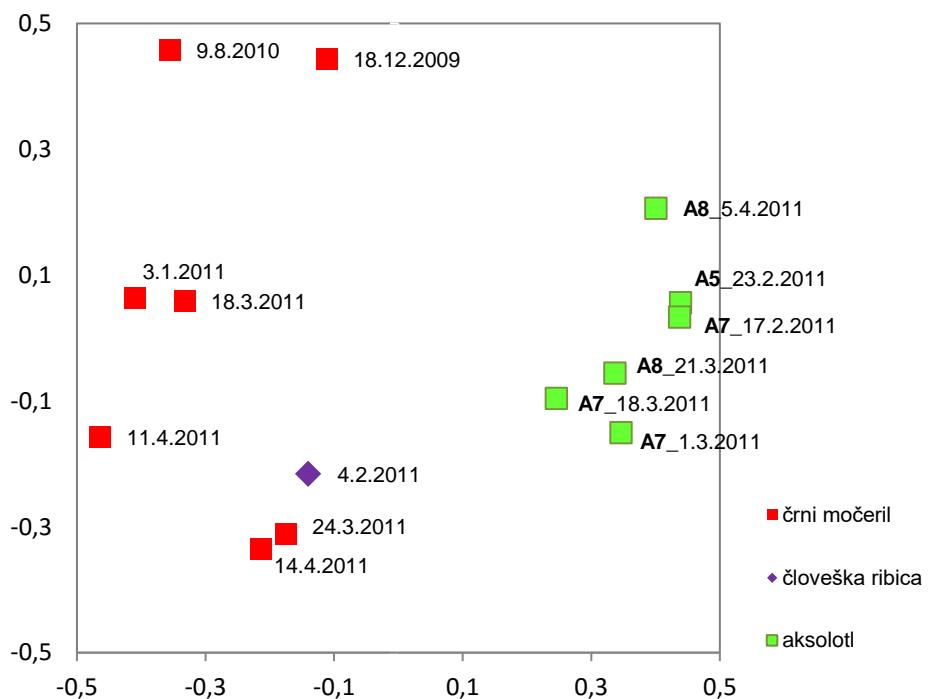
#### 4.3 ANALIZA T-RFLP

Z metodo T-RFLP smo želeli dobiti vpogled v sestavo mikrobne združbe fecesa več vzorcev in ugotoviti, kako se mikrobna združba spreminja v času in kako se razlikuje med različnimi osebkami. Ker je sekvenciranje več vzorcev zahtevnejše in povezano z večjimi stroški, smo se odločili za profiliranje mikrobne združbe z metodo T-RFLP.

Skupno mikrobno DNK smo osamili iz sedmih vzorcev fecesa črnega močerila P16, enega vzorca aksolotla A5, treh vzorcev aksolotla A7, dveh vzorcev aksolotla A8 in za primerjavo še enega vzorca človeške ribice (Po2011). Osamitev celokupne DNK in pomnoževanje delov gena za 16S RNA z reakcijo PCR je potekalo po postopkih opisanih v poglavjih 3.2.1 in 3.2.2. Po cepitvi pomnožkov genov za 16S RNA z restriktično endonukleazo *MspI* smo očiščene fragmente analizirali s kapilarno elektroforezo in dobljene profile T-RFLP analizirali s programom Bionumerics.

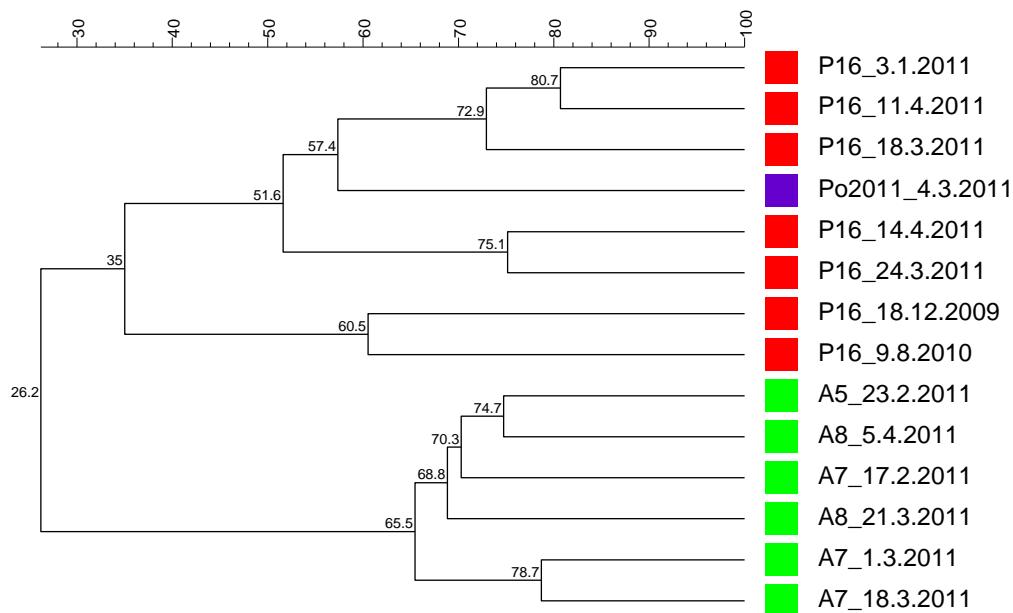
Pri vzorcih aksolotlov in človeške ribice smo imeli dovolj izhodiščnega materiala, zato smo analizo strukture mikrobne združbe izvedli v dveh ponovitvah. Pri vzorcih črnega močerila izhodiščnega materiala ni bilo dovolj, zato smo analizo izvedli samo enkrat.

Podobnost profilov mikrobne združbe smo preverjali z Pearsonovim koeficientom korelacije. Razlike med vsemi preučevanimi vzorci smo prikazali tudi z analizo glavnih koordinat (PCoA). Na diagramu prvih dveh dimenzij so prikazani profili mikrobne združbe vzorcev črnega močerila, treh osebkov aksolotlov in človeške ribice (Slika 9). Fekalna mikrobiota črnega močerila in aksolotlov tvorita dve jasno ločeni gruči. V gručo vzorcev črnega močerila se je uvrstil tudi vzorec človeške ribice, kar pomeni, da je mikrobiota črnega močerila bolj podobna mikrobioti človeške ribice kot mikrobioti aksolotla. Iz slike 9 je tudi razvidno, da se mikrobna združba pri črnem močerilu spreminja skozi čas. Mikrobna združba različnih osebkov aksolotlov pa se med seboj le malo razlikuje.



**Slika 9:** Analiza glavnih koordinat PCoA profilov fekalne mikrobne združbe vzorcev črnega močerila (P16), treh osebkov aksolotlov (A5, A7 in A8) in človeške ribice (Po2011) odvzetih v različnih časovnih obdobjih. Rdeče se označeni fekalni vzorci črnega močerila P16; z zeleno so označeni fekalni vzorci aksolotlov A5, A7 in A8; z vijolično je označen fekalni vzorec človeške ribice Po2011. Oznakam so pripisani datumini vzorčenja feca.

Slika 10 prikazuje dendrogram profilov T-RFLP analiziranih fekalnih vzorcev črnega močerila, aksolotla in človeške ribice. Tudi na tem dendrogramu je opazna jasna ločitev med vzorci črnega močerila in aksolotlov v dve gruči. Mikrobiota aksolotla kaže večjo podobnost in s tem manjše razlike v sestavi med vzorci. V gručo vzorcev črnega močerila se je uvrstil vzorec človeške ribice. Vzorca črnega močerila P16, ki sta bila izolirana 18.12.2009 in 9.8.2010 tvorita svojo gručo in sta bila odvzeta najprej.



**Slika 10: Dendrogram profilov tipizacije bakterijske združbe fekalnih vzorcev črnega močerila P16 človeške ribice Po2011 in aksolotlov A5, A7 in A8.** Z rdečim kvadratom so označeni vzorec črnega močerila P16; z vijoličnim kvadratom je označen vzorec človeške ribice; z zelenim kvadratom vzoreci aksolotlov so označeni. Vrednosti na vozliščih predstavljajo odstotke podobnosti. Oznakam so pripisani datum vzorčenja fecesa.

Vzorca aksolotlov A7, ki sta bila izolirana 1.3.2011 in 18.3.2011 tvorita svojo gručo, tretji vzorec istega osebka, ki je bil izoliran 17.2.2011 se je uvrstil med oba vzorca A8.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Jamska mikrobiologija je dokaj nova veja mikrobiologije, ki se počasi razvija in združuje mikrobiologijo, geologijo in kemijo. Jame so relativno stabilna okolja brez svetlobe, z visoko vlogo in stabilno temperaturo (Hervant in sod., 2001a). Okolje je oligotrofno, zato morajo biti organizmi in njihovi mikrobeni simbionti prilagojeni na omejena hranila in energetsko neugodne razmere. Zaradi tega bi pričakovali majhno pestrost oligotrofnih bakterij, vendar raziskave kažejo, da je mikrobna združba v jamaх tudi precej pестra (Barton in Jurado, 2007).

Mikroorganizmi v jamaх naseljujejo različne habitate in imajo pomembno vlogo v jamskem ekosistemu. Mikroorganizmi se pasivno prenašajo v jame s kroženjem zraka, z vodo, ki pronica in kaplja skozi razpoke v notranjost, nekateri se prenesejo preko živali in ljudi. Le ti večinoma hitro propadejo, njihova biomasa pa vpliva na jamsko okolje. Med različnimi mikroorganizmi potekajo interakcije, prav tako pa tudi med mikroorganizmi in jamskimi živalmi (Mulec, 2008). Raziskovalci v jamaх večinoma preučujejo pestrost mikroorganizmov na jamskih površinah, v vodah, medtem ko raziskav o vsebini prebavnega trakta ali fecesu jamskih živali skoraj ni.

Mikrobiološke raziskave jamskih habitatov so temeljile predvsem na tradicionalnih gojitvenih metodah, ki imajo svoje omejitve, predvsem zaradi nepoznavanja rastnih zahtev določenih mikroorganizmov. Znano je, da na gojiščih v laboratorijskih pogojih lahko gojimo le majhen delež bakterij iz naravnih ekosistemov (Zoetendal in sod., 2004). V zadnjem obdobju raziskovalci uporabljajo predvsem molekularne metode za preučevanje mikrobnih združb v jamaх.

Največ raziskav je bilo v Sloveniji narejenih v Škocijanskih jamaх, vendar samo z gojitvenimi metodami. Analizirali so vodo, ki kaplja iz stropa. Z gojtvenimi metodami so izolirali velik del po Gramu negativnih bakterij: *Enterobacteriaceae*, po Gramu negativne mikraerofilne/aerobne palčke in koke, *Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae* in violacein producirajoče bakterije (Gerič in sod., 2004). Raziskav o mikroorganizmih, prisotnih v izviru Jelševnika, od koder izvira črni močeril, pa nismo zasledili. V raziskavah dveh kraških izvirov in podzemne vode v Švici so z molekularnimi metodami identificirali alfa, beta in gamma proteobakterije, *Firmicutes* ter bakterije z rodu *Nitrospira* in *Acidobacteria* (Pronk in sod., 2009).

Dvoživke so zaščitene živali, zato je pridobivanje vzorcev iz prebavnega trakta oteženo. Črni močeril je tudi ogrožena vrsta, zato je le majhen del živali namenjen raziskovalnim namenom. Za raziskovalne namene na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete gojijo

tako črne močerile kot tudi aksolotle. V okviru diplomske naloge smo zato preučevali mikrobno združbo fecesa obež živali ter tako na neinvaziven način pridobili vzorce za raziskavo. Zaradi večjega števila vzorcev smo lahko spremljali tudi spremnjanje strukture mikrobne združbe skozi čas in pri aksolotlu razlike med preučevanimi živalmi.

V diplomski nalogi smo žeeli ugotoviti, ali je feces črnega močerila in aksolotla primeren vzorec za analizo sestave črevesne mikrobiote. V večini študij analizirajo fekalne vzorce, ker je feces lažje dostopen kot vsebina prebavnega trakta. Najprej smo preverili, ali iz fekalnih vzorcev lahko izoliramo zadostno količino DNK, jo nato uspešno pomnožimo v reakciji PCR in nato sekvenciramo. Tako pri črnem močerilu kot pri aksolotlu, smo uspešno osamili mikrobno DNK in nato pridobili klonske sekvence genov za 16S rRNA, ki smo jih lahko analizirali.

V prebavnem traktu so indigeni mikroorganizmi, ki so del normalne, stalne mikrobiote in mikroorganizmi, ki samo začasno naseljujejo prebavni trakt (Kim in sod., 2007). Raziskovalci so ugotavljali razlike v strukturi mikrobne združbe v prebavnem traktu in fecesu človeka. V raziskavah (Eckburg in sod, 2005; Durban in sod., 2011) so z uporabo molekularno bioloških metod ugotovili, da se strukturi mikrobne združbe v prebavnem traktu in fecesu istega osebka razlikujeta toliko, kot se razlikujeta med dvema osebkoma. Durban in sodelavci (2011) ugotavljajo, da si je mikrobna združba fecesa dveh različnih osebkov med seboj bolj podobna kot feces in vzorec vsebine prebavnega trakta istega osebka.

Zaradi pomanjkanja raziskav, kjer bi z molekularnimi metodami analizirali feces ali vsebino prebavnega trakta dvoživk, smo pregledali literaturo o črevesni mikrobioti rib. Tako kot ribe, sta tudi črni močeril in aksolotl vodna vretenčarja. V normalni črevesni mikrobioti doslej preučenih rib z molekularnimi metodami prevladujejo bakterije iz debla *Proteobacteria*, sledijo bakterije iz debel *Firmicutes* in *Bacteroidetes*. Prebavni trakt rib naseljujejo aerobne, fakultativno anaerobne in anaerobne vrste bakterij. Na mikrobno združbo prebavnega trakta rib vplivajo okoljski in prehranski dejavniki prav tako je odvisna tudi od vrste rib. Prebavni trakti se po zgradbi med različnimi ribami razlikujejo. Prav tako se mikrobna združba razlikuje med različnimi tipi rib. Pri sladkovodnih ribah prevladujejo bakterije iz redov *Aeromonadales* in *Enterobacteriales*. Pri ločitvi rib glede na prehrano so opazili, da pri mesojedih in vsejedih ribah prevladujejo bakterije iz redov *Desulfovibrionales* in *Aeromonadales*, medtem ko iz reda *Bacteriodales* niso bile prisotne. So pa bile prisotne bakterije iz reda *Clostridiales* (Sullam in sod., 2012).

Večina starejših študij mikrobiote rib temelji na gojitvenih tehnikah, ki imajo veliko pomankljivosti. Poleg tega so bakterije iz debel *Firmicutes* in *Bacteroidetes* striktno anaerobne in jih je težko gojiti. Novejših raziskav z molekularnimi tehnikami pa je zaenkrat še premalo, da bi lahko vedeli, kako okoljski, ekološki in evolucijski faktorji vplivajo na strukturo mikrobne združbe rib (Sullam in sod., 2012).

Filogenetska analiza sekvenc pridobljenih v tej študiji je pokazala, da so pri obeh živalih prisotni predstavniki štirih različnih debel. Rezultati analize sekvenc s spletnim orodjem RDP Classifier (Wang in sod., 2007) so pokazali, da se struktura mikrobne združbe črnega močerila in aksolotla razlikuje. Pri črem močerilu prevladujejo sekvene iz debla *Proteobacteria*, kot je to značilno za mikrobioto rib. Pri aksolotlu prevladujejo sekvene, ki so se uvrstile v debli *Bacteroides* in *Firmicutes*, ki sta značilna predstavnika mikrobiote živali (kopenskih vretenčarjev, praviloma sesalcev) in ljudi.

V diplomski nalogi je Simona Gramc (2012) preučevala mikrobno združbo iz vsebine prebavnega trakta in fecesa človeške ribice ter pridobila tudi nekaj sekvenc iz fecesa črnega močerila. Iz sledki so pokazali, da mikrobna združba človeške ribice ni pestra, saj se je 99 % sekvenc uvrstilo v deblo *Firmicutes*, kar je presenetljivo. Mogoče je to posledica tehnične napake, saj smo v naši raziskavi ugotovili precej večjo pestrost mikrobne združbe v obeh ekosistemih. Rezultate težko primerjamo tudi zato, ker smo analizirali samo en vzorec fecesa črnega močerila in pridobili relativno majhno število sekvenc.

Zaradi velikega števila sekvenc s 3' konca pri obeh vzorcih, ki se niso prekrivale s sekvencami iz 5' konca v dovolj velikem obsegu, smo se odločili, da bomo izrisali drevesa tudi za te sekvene in tako izkoristili vse pridobljene rezultate.

### **5.1.1 Proteobakterije**

Iz filogenetskih dreves je razvidno, da se je pri črem močerilu največ sekvenc uvrstilo v deblo *Proteobacteria* in sicer v družino *Aeromonadaceae*. Bakterije iz te družine so fakultativni anaerobi, ki jih pogosto izolirajo iz sladkih voda, ter so znani patogeni tako človeka kot tudi živali. Bakterije iz rodu *Aeromonas* izločajo različne ekstracelularne encime, med njimi tudi hitinaze (Pemberton in sod., 1997). Hitin je osnovna komponenta eksoskeleta členonožcev, s katerimi se črni močeril hrani. Tako imajo lahko bakterije omenjenega rodu vlogo pri razgradnji hitina v prebavnem traktu črnega močerila. V diplomski nalogi je Primon Monika (2006) iz črevesne vsebine človeške ribice izolirala predstavnike rodu *Aeromonas* in dokazala hitinazno aktivnost.

V deblo *Proteobacteria*, družino *Neisseriaceae* so se uvrstile še tri sekvene iz knjižnice črnega močerila, podobne so bile bakterijam iz rodov *Aquitalea* in *Vogesella*. Le te so do sedaj izolirali iz različnih sladkih voda, zato lahko sklepamo, da so v vzorec prišle ob odvzemuh fecesa iz vode.

V knjižnici aksolotla je zanimiva sekvenca G7, ki se je uvrstila v razred *Deltaproteobacteria*. Po pregledu spletnne strani NCBI (angl. The National center for Biotechnology Information) smo ugotovili, da je ta sekvenca podobna cianobakteriji in se uvršča v razred *Melanibacteria*, red *Gastranaerophilales*. To so nefotosintetske cianobakterije, katerih sekvene so doslej pridobili iz fecesa podgane, koale, leteče lisice, krave in tudi človeka (Soo in sod., 2014).

### 5.1.2 Fusobakterije

Pri črnem močerilu so bile prisotne tudi sekvence iz debla *Fusobacteria*, medtem ko pri aksolotlu ni bilo nobene sekvence iz tega debla. Vse sekvence so se uvrstile v družino *Fusobacteriaceae*. V to družino se uvršča tudi rod *Cetobacterium* in vrsta *Cetobacterium somerae*. Ribosomska sekvenca seva BAA-474 je bila najbolj podobna sekvenca gojenih bakterij v bazah podatkov. To vrsto so prvič izolirali iz človeškega fecesa, prav tako pa je indigena bakterija prebavnega trakta več sladkovodnih rib. Proizvaja vitamin B12 (Roeselers in sod., 2011).

### 5.1.3 Firmikuti

Pri črnem močerilu in aksolotlu je bilo zastopano tudi deblo *Firmicutes*. Iz knjižnice črnega močerila se je v to deblo uvrstilo 20 % sekvenc, iz knjižnice aksolotla pa 31 %. V knjižnici črnega močerila so eno večjo filogenetsko skupino tvorile sekvence, ki so se uvrstile v družino *Peptostreptococcaceae* in so najbolj podobne bakteriji *Romboutsia lituseburensis*. To bakterijo so prvič izolirali iz zemlje in humusa Slonokoščene obale, kasneje tudi iz anaerobnih čistilnih naprav. Ostale vrste tega rodu pa so izolirali iz vsebine prebavnega trakta in fecesa miši, podgan, psov, krav in človeka (Gerritsen, 2015), zaradi česar lahko sklepamo, da bi tudi *R. lituseburensis* lahko bila prisotna v prebavnem traktu. Sedem sekvenc se je pri knjižnici črnega močerila uvrstilo v rod *Clostridium*, filogenetsko skupino sensu stricto1. Bakterije iz te skupine so pogosto izolirali (oz. pridobili njihove sekvence) iz prebavnega trakta živali in človeka.

Večjo filogenetsko skupino iz knjižnice aksolotla tvorijo sekvence, ki so podobne negojenim bakterijam iz družine *Lachnospiraceae*. Štiri sekvence so se uvrstile med sekvence iz družine *Ruminococcaceae*. Bakterije teh dveh družin so pogosto prisotne v prebavnem traktu sesalcev. Sekvenc, ki so se uvrstile v družino *Erysipelotrichaceae*, je bilo pet. Bakterije iz te družine tudi najdemo v prebavnem traktu živali in ljudi. V več raziskavah so ugotovili, da obstaja povezava med bakterijami iz družine *Erysipelotrichaceae* in gostiteljevim lipidnim metabolizmom (Kaakoush, 2015). Bakterija, ki se je uvrstila najbliže sekvencam iz knjižnice aksolotla je *Faecalitalea cylindroides*, ki so jo izolirali iz fecesa človeka in vsebine prebavnega trakta piščanca, prašiča in človeka (De Maesschalck in sod., 2014).

### 5.1.4 Bakteroidete

Sekvence, ki so se uvrstile v deblo *Bacteroidetes* so bile prisotne pri obeh živalih, vendar so pri aksolotlu predstavljale več kot polovico vseh sekvenc, pri črnem močerilu pa manj kot 15 %. Vse sekvence iz knjižnice črnega močerila so se uvrstile v družino *Porphyromonadaceae*, v katero se uvršča več rodov. Predstavnike teh rodov so izolirali iz

vsebine prebavnega trakta piščancev ter iz fecesa piščancev, podgan in človeka. Prav tako so jih izolirali iz ustne votline živali in ljudi. Sekvence iz knjižnice črnega močerila so se uvrstile najbližje novopredlaganemu rodu *Macellibacteroides*, katerega predstavnika so nedavno izolirali iz anaerobnega reaktorja (Jabari in sod., 2012). Zanimivo je, da smo predstavnike tega rodu odkrili v fecusu črnega močerila. Iz knjižnice aksolotla so se v to družino uvrstile štiri sekvence, dve od teh sta najbolj podobni sekvenci bakterije *Parabacteroides distasonis*. To bakterijo so pogosto izolirali iz fecesa človeka. Pri knjižnici aksolotla se je največ sekvenc uvrstilo v dve večji filogenetski skupini. Obe sta še najbolj podobni sekvencam negojenih predstavnikov družine *Bacteroidaceae*. Tri sekvence pa so podobne bakterijam iz družine *Rikenellaceae*. Od sekvenc že gojenih članov bakteroidet, so med predstavniki iz družine *Bacteroidaceae* *Bacteroides salyersiae* (Song in sod., 2004) in *Parabacteroides distasonis* (Sakamoto in Benno, 2006). Dve sekvenci sta najbližje bakteriji *Rikenella microfusus*, ki so jo izolirali iz fecesa ali vsebine prebavnega trakta teličkov, piščancev in japonskih prepelic. Ena sekvanca pa je podobna negojeni bakteriji iz rodu *Alistipes*. Prvič so bakterijo tega rodu izolirali iz fecesa človeka (Mishra in sod., 2012).

### **5.1.5 Verukomikrobiye**

V knjižnici aksolotla so bile prisotne tudi sekvence, ki so se uvrstile v deblo *Verrucomicrobia*, medtem ko pri črnem močerilu ni bilo nobene sekvence iz tega debla. Uvrstile so se v družino *Verrucomicrobiaceae*, najbližje sekvencam so se uvrstile negojenе bakterije iz rodu *Akkermansia*. V ta rod uvrščamo bakterijo *Akkermansia muciniphila*, ki so jo izolirali iz fecesa človeka in je pogost predstavnik v prebavnem traktu. Razgrajuje mukus, ki v prebavnem traktu ščiti epitelij črevesja pred patogenimi mikroorganizmi, hkrati pa je tudi ekološka niša za črevesne bakterije (Derrien in sod., 2004).

Sekvence, ki smo jih pridobili iz obeh živali, so podobne sekvencam, ki so bile pridobljene iz prebavnega trakta ali fecesa živali in človeka. Večina sekvenc je bila podobna negojenim predstavnikom, kot smo tudi pričakovali.

### **5.1.6 Analiza profilov T-RFLP**

Analizo smo izvedli le pri enem črnem močerilu, vendar z večkratnim vzorčenjem skozi daljše časovno obdobje (18.12.2009 - 14.4.2011). Tako smo lahko ugotavljali, kako se mikrobna združba fecesa istega osebka spreminja skozi čas. Vzorci so bili vzorčeni v obdobju 16 mesecev. Vzorca P16, ki sta bila vzorčena veliko prej kot ostali vzorci, sta se v dendrogramu uvrstila ločeno od ostalih vzorcev črnega močerila. Nato si vzorci sledijo po datumu vzorčenja, razen vzorca P16, ki je bil vzorčen 24.3.2011, in se je uvrstil bližje P16, ki je bil vzorčen 14.4.2011.

Pri aksolotlu smo preučili vzorce treh osebkov in tako ugotavljali razlike med vzorci pripadnikov iste vrste. Ugotovili smo, da se mikrobna združba fecesa med osebki razlikuje, vendar manj kot se je razlikovala mikrobna združba v fecesu črnega močerila v odvisnosti od časa vzorčenja. V primeru aksolotla A7 smo preučili tudi tri vzorce, ki so bili vzorčeni v različnih obdobjih. Vsi vzorci aksolotla so med seboj pomešani in vzorci istega osebka niso tvorili svoje gruče.

Analiza profilov T-RFLP je pokazala, da se strukturi mikrobne združbe fecesa črnega močerila in aksolotlov med seboj jasno razlikujeta. Profili kažejo očitno ločitev obeh gruč, stopnja podobnosti znotraj iste vrste živali je večja kot med obema preučevanima vrstama živali. Mikrobna združba fecesa človeške ribice je bolj podobna mikrobni združbi fecesa črnega močerila kot aksolotla, kar smo pričakovali.

## 5.2 SKLEPI

- Fekalni vzorci črnega močerila in aksolotla so primerni za analizo strukture in sprememb v strukturi črevesne mikrobiote.
- Črevesni mikrobnii združbi črnega močerila in aksolotla se razlikujeta.
- Analiza z metodo T-RFLP kaže, da se mikrobnia združba vzorcev fecesa črnega močerila spreminja skozi čas.
- V klonski knjižnici črnega močerila prevladuje deblo *Proteobacteria*, v knjižnici aksolotla pa deblo *Bacteroidetes*. V obeh knjižnicah je prisotno deblo *Firmicutes*. V knjižnici črnega močerila je prisotno tudi deblo *Fusobacteria*, ki ga v knjižnici aksolotla ni, medtem ko je v knjižnici aksolotla prisotno deblo *Verrucomicrobia*, ki ga ni v knjižnici črnega močerila.

## 6 POVZETEK

Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*) je podvrsta človeške ribice in belokranjski endemit. Močerili so največji poznani jamski vretenčarji, za katere je značilna neotenija in dolga življenjska doba. Poleg tega so sposobni dolgotrajnega stradanja. V zadnjih letih je bilo objavljenih veliko število raziskav o mikrobioti prebavnega trakta ljudi in živali (predvsem kopenskih, večinoma sesalcev), ter pomenu mikroorganizmov v njem. Tako stradanje kot dolgoživost sta dejavnika, ki ju raziskovalci povezujejo s strukturo in spremembami v črevesni mikrobioti.

V sklopu diplomske naloge smo žeeli spoznati fekalno mikrobioto črnega močerila. Za primerjavo smo v nalogi vključili fekalne vzorce mehiškega aksolotla (*Ambystoma mexicanum*), ki je dvoživka s podobnim življenjskim slogom. Dvoživke so zaščitene živali, zato je pridobivanje vzorcev iz vsebine prebavnega trakta oteženo. V nalogi smo preučevali primernost iztrebkov močerilov in aksolotlov za molekularno biološko analizo strukture fekalne mikrobiote, kar bi omogočilo nadaljnje raziskave brez žrtvovanja ujetih živali. Preverili smo, ali je iz fekalnih vzorcev mogoče izolirati skupno mikrobnou DNK, ki bi jo nato lahko naprej preučevali. Iz nje smo poskušali z verižno rekacijo s polimerazo reakcijo (PCR) pomnožiti ribosomske gene, ter pomnožke klonirati in sekvencirati. Tako pri črnem močerilu kot pri aksolotlu, smo iz fekalnih vzorcev uspešno osamili in pripravili dovolj skupne mikrobne DNK, da smo lahko izvedli vse omenjene postopke.

S filogenetsko analizo smo ugotovili, da se mikrobnii združbi iz fecesa črnega močerila in aksolotla med seboj razlikujeta. Pri črnem močerilu se je največ sekvenca uvrstilo v deblo *Proteobacteria* (39 %), sledijo sekvenca iz debla *Fusobacteria* (28 %), *Firmicutes* (20 %) in *Bacteroidetes* (13 %). Pri aksolotlu se je največ sekvenca uvrstilo v deblo *Bacteroidetes* (57 %), sledijo *Firmicutes* (31 %), *Verrucomicrobia* (10 %) in *Proteobacteria* (2 %). Izrisali smo filogenetska drevesa in ugotovili, da je večina pridobljenih sekvenca podobna sekvencam negojenih, ter v nekaterih primerih sekvencam že znanih predstavnikov iz vsebine prebavnega trakta ali fecesa doslej preučenih živali in ljudi.

Analiza fekalnih vzorcev z metodo T-RFLP je prav tako pokazala razliko med mikrobnou združbo črnega močerila in aksolotla. Preučili smo več vzorcev fecesa črnega močerila, ki so se razlikovali po datumu vzorčenja, vzorce fecesa različnih osebkov aksolotlov ter za primerjavo en vzorec fecesa človeške ribice (navadnega močerila). Profili T-RFLP iz fekalnih vzorcev obeh vrst živali so se med sabo jasno ločili. Profil fekalnega vzorca človeške ribice se je uvrstil bliže profilom črnega močerila. Pri vzorcih črnega močerila smo tudi ugotovili, da se mikrobnou združba spreminja skozi čas. Mikrobnou združba različnih aksolotlov se med seboj tudi razlikuje, a so bili vzorci med sabo bolj podobni, kot so si bili podobni vzorci istega črnega močerila, ki so bili odvzeti v različnih časovnih obdobjih.

## 7 VIRI

Aljančič M., Bulog B., Kranjc A., Josipovič D., Sket B., Skoberne P., Hodalič A., Habič P. 1993. *Proteus*: skrivnostni vladar kraške teme. Ljubljana, Vitrum: 75 str.

Barton H.A., Jurado V. 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*, 2, 3: 132-138

Bates J. M., Mittge E., Kuhlman J., Baden K. N., Cheesman S. E., Guillman K. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Developmental Biology*, 297: 374-386

Bizjak Mali L. 1995. Histološke, histokemiske in ultrastruktурне analize prebavnega trakta močerila (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 108 str.

Bizjak Mali L., Bulog B. 1996. Ultrastructural alterations of gastric surface mucous cells of cave salamander *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata) during food deprivation. *Journal of Computer-Assisted Microscopy*, 8, 4: 241-243

Bizjak Mali L., Bulog B. 2004. Histology and ultrastructure of the gut epithelium of the neotenic cave salamander, *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *Journal of Morphology*, 259: 82-89

Bizjak Mali L., Sepčić K., Bulog B. 2013. Long-term starvation in cave salamander effects on liver ultrastructure and energy reserve mobilization. *Journal of Morphology*, 274, 8: 887-900

Bulog B. 1994. Dve desetletji funkcionalno-morfoloških raziskav pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). *Acta Carsologica*, 23: 247-263

Bulog B., Bizjak Mali L., Kos M., Mihajl K., Prelovšek P.M., Aljančič G. 2000. Biology and functional morphology of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *Acta Biologica Slovenica*, 43, 3: 85-102

Bulog B. 2013. Človeška ribica. V: Narava Bele krajine. Ivanovič M., Štangelj M. (ur.). Metlika, Belokranjski muzej Metlika: 175-184

Clare J.P. 2012. Axolotls: Introduction. Axolotl.org: 3 str.  
<http://www.axolotl.org/index.htm> (20. apr. 2016)

Cole J.R., Wang Q., Fish J.A., Chai B., McGarrell D.M., Sun Y., Brown C.T., Porras-Alfaro A., Kuske C.R., Tiedje J.M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. Nucleic Acids Research, 42: 633-642

Colombo B.M., Scalvenzi T., Benlamara S., Pollet N. 2015. Microbiota and mucosal immunity in amphibians. Frontiers in Immunology, 6: 111, doi: 10.3389/fimmu.2015.00111: 15 str.

Configliachi P., Rusconi M. 1818. Del proteo anguino di Laurenti. Monografia. Galeazzi, VII, Pavia: 119 str.

Contreras V., Martínez- Meyer E., Valiente E., Zambrano L. 2009. Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). Biological Conservation, 142: 2881-2885

De Maesschalck C., Van Immersel F., Eeckhaut V., De Baere S., Cnockaert M., Croubels S., Haesebrouck F., Ducatelle R., Vandamme P. 2014. *Faecalicoccus acidiformans* gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of *Streptococcus pleomorphus* (Barnes *et al.* 1977), *Eubacterium biforme* (Eggerth 1935) and *Eubacterium cylindroides* (Cato *et al.* 1974) as *Faecalicoccus pleomorphus* com. nov., *Holdemanella biformis* gen. nov., comb. nov. and *Faecalitalea cylindroides* gen. Nov., comb. nov., respectively, within the family *Erysipelotrichaceae*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64: 3877-3884

Derrien M., Vaughan E.E., Plugge C.M., de Vos W.M. 2004. *Akkermansia muciniphila* gen. Nov., sp. Nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1469-1476

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Dalevi D., Hu P., Andersen G.L. 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. Applied and Environmental Microbiology, 72, 7: 5069-5072

Dunbar J., Ticknor L. O., Kuske C. R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. Applied and Environmental Microbiology, 67, 1: 190-197

Durbán A., Abellán J.J., Jiménez-Hernández N., Ponce M., Ponce J., Sala T., D'Auria G., Latorre A., Moya A. 2011. Assessing gut microbial diversity from feces and rectal mucosa. Microbial Ecology, 61: 123-133

Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308, 5728: 1635-1638

Fryer B., 2004. *Ambystoma mexicanum*. Berkely, Amphibiaweb: 2 str.  
<http://amphibiaweb.org/species/3842> (20. apr. 2016)

Gerič B., Pipan T., Mulec J. 2004. Diversity of culturable bacteria and meifauna in the epikarst of Škofjanske jame caves (Slovenia). *Acta Carsologica*, 33, 1: 301-309

Gerritsen J. 2015. The genus *Romboutsia*- Genomic and functional characterization of the novel bacteria dedicated to life in the intestinal tract. PhD thesis. Wageningen, Wageningen University: 280 str.

Gramc S. 2012. Opis mikrobne združbe iz vsebine prebavnega trakta in iztebkov močerila (*Proteus anguinus*) z molekularnimi metodami. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 55 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

Hao W.-L., Lee Y.-K. 2004. Microflora of the gastrointestinal tract. *Methods in Molecular Biology*, 268: 491-502

Hervant F., Mathieu J., Durand J. 2001a. Behavioral, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *Journal of Experimental Biology*, 204: 269-281

Hervant F., Mathieu J., Durand J.P. 2001b. Circadian rhythmicity, respiration and behavior in hypogea and epigean salamanders. *Natura Croatia*, 10, 3: 141-152

Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20: 2317-2319

Hugenholtz P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology*, 3, 2: 1-8

Ivanović A., Aljančič G., Arntzen J. W. 2013. Skull shape differentiation of black and white olms (*Proteus anguinus anguinus* and *Proteus a. parkelj*): an exploratory analysis with micro-CT scanning. *Contributions to Zoology*, 82, 2: 107-114

Jabari L., Gannoun H., Cayol J.-L., Hedi A., Sakamoto M., Falsen E., Ohkuma M., Hamdi M., Fauque G., Ollivier B., Fardeau M.-L. 2012. *Macellibacteroides fermentas* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Porphyromonadaceae* isolated from an upflow anaerobic filter treating abattoir wastewaters. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62: 2522-2527

Kaakoush N.O. 2015. Insights into the role of *Erysipelotrichaceae* in the human host. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 5: 84, doi: 10.3389/fcimb.2015.00084: 4 str.

Kalle E., Kubista M., Rensing C. 2014. Multi-template polymerase chain reaction. Biomolecular Detection and Quantification, 2: 11-29

Kanagawa T. 2003. Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). Journal of Bioscience and Bioengineering, 96, 4: 317-323

Kim D.-H., Brunt J., Austin B. 2006. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Microbiology, 102: 1654-1664

Kitts C. L. 2001. Terminal Restriction Fragment Patterns: A tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. Current Issues in Intestinal Microbiology, 2: 17-25

Kostic A.D., Howitt M.R., Garrett W.S. 2013. Exploring host-microbiota interactions in animal models and humans. Genes & Development, 27: 701-718

Li F., Hullar M.A.J., Lampe J.W. 2007. Optimization of terminal restriction fragment polymorphism (TRFLP) analysis of human gut microbiota. Journal of Microbiological Methods, 68: 303-311

Li M., Gong J., Cottrill M., Yu H., de Lange C., Burton J., Topp E. 2003. Evaluation of QIAamp®DNA stool mini kit for ecological studies of gut microbiota. Journal of Microbiological Methods, 54: 13-20

Mishra A.K., Gimenez G., Lagier J.C., Robert C., Raoult D., Fournier P.E. 2012. Genome sequence and description of *Alistipes senegalensis* sp. nov. Standards in Genomic Science, 6: 304-314

Mulec J. 2008. Microorganisms in hypogean: examples from slovenian karst caves. Acta Carsologica, 37, 1: 153-160

Noble G.K. 1931. The biology of the amphibia. New York, McGraw-Hill: 602 str.

Osborn A. M., Moore E. R. B., Timmis K. N. 2000. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2, 1: 39-50

Pemberton J.M., Kidd S.P., Schmidt R. 1997. Secreted enzymes of *Aeromonas*. *FEMS Microbiology Letters*, 152: 1-10

Prakash O., Pandey P.K., Kulkarni G.J., Mahale K.N., Shouche Y.S. 2014. Technicalities and glitches of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). *Indian Journal of Microbiology*, 54, 3: 255-261

Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeč seznam. 2002. Uradni list Republike Slovenije, 12, 82: 8893-8975

Primon M. 2009. Opis nekaterih fenotipskih lastnosti in plazmidi bakterij izoliranih iz prebavil človeške ribice (*Proteus anguinus*). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 106 str.

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

Pruesse, E., Peplies J., Glöckner F.O. 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28: 1823-1829

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*: 41, D1: D590-D596

Rastogi G., Sani R.K. 2011. Molecular techniques to asses microbial community structure, function, and dynamics in the environment. V: *Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications*. Ahmad I., Ahmad F., Pichtel J. (eds.). New York, Springer: 29-57

Roeselers G., MittgeE.K., Stephens W.Z., Parichy D.M., Cavanaugh C.M., Guillemin K., Rawls J.F. 2011. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME Journal*, 5: 1595-1608

Roy S., Lévesque M. 2006. Limb regeneration in axolotl: Is it superhealing? *Scientific World Journal*, 6, 51: 12-25

Sakamoto M., Benno Y. 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov.,

*Parabacteroides goldsteinii* comb. nov and *Parabacteroides merdae* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1599-1605

Salonen A., Nikkilä J., Jalanka-Tuovinen J., Immonen O., Rajilić-Stojanović M., Kekkonen R.A., Palva A., de Vos W.M. 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: Effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. Journal of Microbiological Methods, 81: 127-134

Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartman M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. 2009. Introducing mothur: Open source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology, 75, 23: 7537-7541

Schütte U. M. E., Abdo Z., Bent S. J., Shyu C., Williams C. J., pierson J. D., Forney L. J. 2008. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. Applied Microbiology and Biotechnology, 80: 365-380

Sket B., Arntzen J. W. 1994. A black non-troglobitic amphibian from the karst of Slovenia: *Proteus anginus parkelj* n. ssp. (Urodela: Proteidae). Bijdragen tot de Dierkunde, 64, 1: 33-53

Song Y.L., Liu C.X., McTeague M., Finegold S.M. 2004. "*Bacteroides nordii*" sp. nov. and "*Bacteroides salyersae*" sp. nov. isolated from clinical specimens of human intestinal origin. Journal of Clinical Microbiology, 42, 12: 5565-5570

Soo R.M., Skennerton C.T., Sekiguchi Y., Imelfort M., Paech S.J., Dennis P.G., Steen J.A., Parks D.H., Tyson G.W., Hugenholtz P. 2014. An expanded genomic representation of the phylum *Cyanobacteria*. Genom Biology and Evolution, 6, 5: 1031-1045

Stevens E.C., Hume I.D. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. Physiological Reviews, 78, 2: 393-427

Sullam K.E., Essinger S.D., lozupone C.A., O'Connor M.P., Rosen G.L., Knight R., Kilham S.S., Russell J.A. 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. Molecular Ecology, 21: 3363-3378

Tamura K., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood evolutionary distance and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739

Tang J., Zeng Z., Wang H., Yang T., Zhang P., Li Y., Zhang A., Fan W., Zhang Y., Yang X., Zhao S., Tian G., Zou L. 2008. An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods*, 75: 432-436

Vandel A. 1965. Biospeleology: the biology of cavernicolous animals. 1st edition. Oxford, Pergamon Press: 547 str. Cit. po Bizjak Mali L. 1995. Histološke, histokemijske in ultrastrukturne analize prebavnega trakta močerila (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 108 str.

von Wintzingerode F., Göbel U. B., Stackebrandt E. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21: 213-229

Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. 2007. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5261-5267

Zoetendal E.G., Cheng B., Koike S., Mackie R.I. 2004. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5: 31-48

Zoetendal E.G., Collier C.T., Koike S., Mackie R.I., Gaskins H.R. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: A review. *Journal of Nutrition*, 134: 465-472

## ZAHVALA

Rada bi se zahvalila mentorju prof. Avguštinu za usmerjanje tekom diplomske naloge, predvsem ko so se pojavljale težave ☺ in pregled naloge.

Najlepša hvala tudi somentorici dr. Lijani Fanedl za vso pomoč tekom celotne naloge, nasvete in odgovarjanje na nešteto vprašanj, ki sem jih imela.

Zahvalila bi se tudi recenzentki dr. Bizjak Malijevi za strokovni pregled diplomske naloge in vso jemanje, shranjevanje in posredovanje vseh vzorcev, da sem lahko izvedla praktični del.

Hvala tudi staršem za potrpežljivost ob čakanju na diplomo. ☺

## PRILOGE

## PRILOGA A: T-RFLP-matrika distanc za vzorce črnega močerila, aksolotlov in človeške ribice.

Matrika	distanc
P16_3.1.2011	0.00
P16_11.4.2011	19.29 0.00
P16_18.3.2011	27.12 26.99 0.00
Po2011_4.3.2011	46.93 51.27 29.73 0.00
P16_14.4.2011	58.41 45.52 61.27 52.11 0.00
P16_24.3.2011	46.41 39.83 40.87 42.61 24.85 0.00
P16_18.12.2009	49.83 74.10 46.31 66.19 76.47 75.05 0.00
P16_9.8.2010	46.48 66.15 45.11 81.35 79.96 72.81 39.47 0.00
A5_23.2.2011	86.38 89.93 82.59 74.15 79.27 70.24 69.49 88.33 0.00
A8_5.4.2011	81.85 89.85 75.48 72.24 83.56 77.16 56.71 80.99 25.27 0.00
A7_17.2.2011	86.55 91.11 75.98 72.07 78.51 71.54 70.51 89.95 29.73 29.70 0.00
A8_21.3.2011	74.03 78.27 70.70 52.98 75.42 64.49 69.19 91.07 31.98 30.55 30.95 0.00
A7_1.3.2011	81.02 85.07 69.60 57.37 67.83 52.45 75.49 90.39 38.03 40.59 29.93 35.20 0.00
A7_18.3.2011	67.61 77.86 66.37 50.75 55.65 34.39 64.09 76.17 32.50 34.45 32.56 33.16 21.31 0.00

