

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Aleksander MAHNIČ

**VPLIV BOGATITVE Z LIGNINOM NA SESTAVO
BAKTERIJSKIH LAKAZNIH GENOV V TALNIH
MIKROKOZMIH**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Aleksander MAHNIČ

**VPLIV BOGATITVE Z LIGNINOM NA SESTAVO BAKTERIJSKIH
LAKAZNIH GENOV V TALNIH MIKROKOZMIH**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**INFLUENCE OF LIGNIN AMENDMENT ON THE STRUCTURE OF
BACTERIAL LACCASE GENES IN SOIL MICROCOSMS**

M.SC. THESIS
Master Study Programmes – Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mikrobiologijo, Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Ines Mandić-Mulec in za recenzentko doc. dr. Marjetko Suhadolc.

Mentorica: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Recenzentka: doc. dr. Marjetko Suhadolc

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Marjetka SUHADOLC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisan se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Aleksander Mahnič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.26:577.15:631.461(043)=163.6
KG	mikrobna ekologija / mikrobne združbe / lakaze / Ljubljansko visoko barje / talni mikrokozmi / DGGE / aktivnost fenol oksidaz / mikrobna respiracija
AV	MAHNIČ, Aleksander, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	MANDIČ-MULEC, Ines (mentorica)/SUHADOLC, Marjetka (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2014
IN	VPLIV BOGATITVE Z LIGNINOM NA SESTAVO BAKTERIJSKIH LAKAZNIH GENOV V TALNIH MIKROKOZMIH
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XI, 56 str., 12 pregl., 17 sl., 19 pril., 141 vir.
IJ	Sl
JJ	sl/en
AI	Razgradnja lignina predstavlja zahteven korak v industrijah, kjer je rastlinska biomasa izhodna surovina ali vir energije. Zaradi visokega energetskega vložka za mehansko razbitje lignoceluloze in okolju nevarnih stranskih produktov kemijske razgradnje, je encimska razgradnja zanimiva alternativa klasičnim postopkom. Namen magistrskega dela je bil proučiti tla Ljubljanskega barja (pH ~ 4) kot potencialni vir še neopisanih proteobakterijskih lakaz, ki bi sodelovale pri razgradnji polimerizirane oblike lignina. Postavili smo hipotezo, da bo obogatitev tal z ligninom in/ali ferulično kislino vplivala na aktivnost mikroorganizmov (fenol oksidazno aktivnost, mikrobno respiracijo) ter sestavo mikrobne združbe v tleh (na nivoju genov za 16S rRNA in domnevnih proteobakterijskih lakaz). V mikrokozmi pripravljenih s kislimi šotnimi tlemi smo skozi daljše obdobje periodično merili celokupno aktivnost fenol oksidaz s testom razgradnje 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kisline) ABTS, spremljali respiracijsko aktivnost mikrobne združbe ter spremembe v DGGE (gelska elektroforeza z gradientom denaturanta) profilih genov za proteobakterijske lakaze in 16S rRNA. Pokazali smo, da dodatek lignina ne vpliva na aktivnost fenol oksidaz v tleh, celokupno respiracijo združbe pa minimalno zviša. Ferulična kislina, kot lahko razgradljiv substrat, signifikantno poveča celokupno respiracijo, v nasprotju s pričakovanji pa na neznan način inhibira reakcijo fenol oksidaz ali pa povzroča lažno nizke meritve testa oksidacije ABTS. Pokazali smo, da se profili na gelu z gradientom denaturanta (DGGE) s časom značilno spreminjajo ter na dendrogramu časovno ločijo z največjimi spremembami praviloma po enem tednu inkubacije v mikrokozmi. Iz DGGE gelov z 16S rRNA geni smo uspešno izrezali ter sekvencirali 13 lis ter jih na podlagi analize z orodjem BLAST (Basic local alignment search tool) (NCBI, 2013) vse uvrstili v rod <i>Burkholderia</i>.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 579.26:577.15:631.461(043)=163.6
CX microbial ecology / microbial communities / laccases / Ljubljana marsh / soil microcosms / DGGE / activity of phenol oxidases / microbial respiration
AU MAHNIČ, Aleksander
AA MANDIČ-MULEC, Ines (supervisor)/ SUHADOLC, Marjetka (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TI INFLUENCE OF LIGNIN AMENDMENT ON THE STRUCTURE OF BACTERIAL LACCASE GENES IN SOIL MICROCOSMS
DT M. SC. THESIS (Master Study Programmes – Field Microbiology)
NO XI, 56 p., 12 tab., 17 fig., 19 ann., 141 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Lignin is the main structural glue of lignocellulose. In industries, where plant biomass is used as a source of novel chemicals or bioenergy, decomposition of lignocellulose and especially lignin remains an important strategic and economic problem. Because of high financial input for mechanical breakdown and potentially toxic residues from chemical degradation, enzymatic approach established itself as an interesting alternative. The aim of this thesis was to explore the Ljubljana marsh soil (pH ~ 4) as a source of novel proteobacterial laccases that may be potentially involved in degradation of lignin polymers. Our hypothesis was that enrichment of peat soil with lignin and/or ferulic acid will influence phenol oxidase activity, total respiration of microbial community and the composition of 16S rRNA and proteobacterial laccase genes in peat soil microcosms. Microcosms were incubated for 11- 30 days and the activity of phenol oxidases was periodically determined by 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) oxidation assay. We also measured total soil respiration and monitored changes in DGGE (denaturant gradient gel electrophoresis) profiles of laccase and 16S rRNA genes. The work shows, that addition of lignin does not affect activity of phenol oxidases and only minimally increases total community respiration. On the other hand, ferulic acid as an easily accessible substrate significantly increases total respiration and contrary to our expectations, either inhibits phenol oxidase activity or causes false low measurements of the ABTS assay. DGGE profiles of bacterial laccase and 16S rRNA genes changed during incubation, with most differences accumulating during the first week of incubation. Sequencing of 13 DGGE bands that showed changes revealed, that they all represent *Burkholderia* species.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNO O LAKAZAH	3
2.2 STRUKTURA LAKAZNIH ENCIMOV	4
2.2.1 Mehanizem delovanja lakaz	5
2.2.2 Fizikalne in kemijske lastnosti lakaz	5
2.2.3 Aplikacije lakaz	6
2.3 RAZGRADNJA LIGNINA	8
2.4 FERULIČNA KISLINA	9
2.5 ZNAČILNOSTI TAL LJUBLJANSKEGA BARJA	10
3 MATERIALI IN METODE DELA	11
3.1 MATERIALI	11
3.1.1 Laboratorijska oprema	11
3.1.2 Kemikalije in kompleti za izolacijo ter čiščenje dna	12
3.1.3 Pufri in raztopine	13

3.1.4	PCR začetni oligonukleotidi	13
3.2	METODE	13
3.2.1	Vzorčenje	14
3.2.2	Karakterizacija tal	15
3.2.2.1	pH	15
3.2.2.2	Vlažnost	15
3.2.2.3	WHC (zadrževalna kapaciteta vode)	15
3.2.2.4	Delež WHC	15
3.2.3	Priprava mikrokozmov	16
3.2.4	Aktivnost fenol oksidaz	17
3.2.5	Merjenje CO₂ v plinski fazi mikrokozma	17
3.2.6	Izolacija DNA	18
3.2.7	Pomnoževanje fragmentov genov za lakaze	18
3.2.8	Pomnoževanje fragmentov 16S rRNA	19
3.2.9	Gelska elektroforeza z gradientom denaturanta (DGGE)	20
3.2.9.1	Izrez lis iz DGGE gela ter sekvenciranje	20
4	REZULTATI	22
4.1	LASTNOSTI PREUČEVANIH VZORCEV TAL	22
4.2	AKTIVNOST FENOL OKSIDAZ	22
4.2.1	Aktivnost fenol oksidaz pri prvem eksperimentu (vzorec tal D)	23
4.2.1.1	Vpliv dodatka alkali lignina na aktivnost fenol oksidaz	23
4.2.1.2	Primerjava aerobno ter anaerobno inkubiranih vzorcev tal	24
4.2.2	Aktivnost fenol oksidaz pri drugem eksperimentu (vzorec tal D)	25
4.4	IZOLACIJA DNA	27
4.5	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)	27
4.6	LOČEVANJE GENOV ZA LAKAZE Z ELEKTROFOREZO Z GRADIENTOM DENATURANTA (DGGE)	30
4.7	ELEKTROFOREZA Z GRADIENTOM DENATURANTA (DGGE) S 16S rRNA GENI	34
4.7.1	Sekvenciranje izrezanih lis	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	36

5.1	RAZPRAVA	36
5.1.1	Aktivnost fenol oksidaz	37
5.1.1.1	Vpliv aerobne/anaerobne inkubacije na aktivnost fenol oksidaz	37
5.1.1.2	Izbira lignina	38
5.1.1.3	Vpliv pH na aktivnost fenol oksidaz	39
5.1.1.4	Vpliv ferulične kisline na aktivnost fenol oksidaz	39
5.1.2	Hitrost respiracije	39
5.1.3	Gelska elektroforeza z gradientom denaturanta	40
5.1.3.1	Analiza genov za proteobakterijske lakaze	40
5.1.4	Analiza genov za 16S rRNA.....	41
5.2	SKLEPI.....	43
6	POVZETEK.....	44
7	VIRI.....	45

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Uporabljena laboratorijska oprema.....	11
Preglednica 2: Uporabljeni laboratorijski pripomočki.....	11
Preglednica 3: Uporabljeni reagenti.....	12
Preglednica 4: Tris-acetatni pufer za elektroforezo (TAE), 50X.....	13
Preglednica 5: Receptura za pripravo založnih raztopin 8 % akrilamidnega gela.....	13
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, ki so bili uporabljeni v raziskovalnem delu.....	13
Preglednica 7: Prva vgnezdna PCR reakcija za pomnoževanje daljših fragmentov genov za lakaze.	18
Preglednica 8: Druga vgnezdna PCR reakcija za pomnoževanje kratkih fragmentov genov za lakaze.....	19
Preglednica 9: PCR s padajočo temperaturo prileganja za pomnoževanje ohranjene regije 16S rRNA.	20
Preglednica 10: Lastnosti vzorcev tal, vzorčenih v Kozlarjevem gozdu.	22
Preglednica 11: Karakterizacija tal, ki so bila v septembru 2008 vzorčena na istem področju kot naši vzorci in sicer za potrebe študije Ausec in sod. (2009).	22
Preglednica 12: BLASTx (NCBI, 2013) analiza sekvenc genov za 16S rRNA, ki so bili izrezani iz DGGE gela.....	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz lakazne strukture (Dwivedi in sod., 2011).....	4
Slika 2: Strukturna formula ferulične kisline (Lu in sod., 2005).....	9
Slika 3: Hodogram eksperimenta.....	14
Slika 4: Aktivnost fenol oksidaz vzorca tal A pri pH reakcijske mešanice 4,0.....	23
Slika 5: Aktivnost fenol oksidaz vzorca tal B pri pH reakcijske mešanice 4,0.....	24
Slika 6: Aktivnost fenol oksidaz v okviru drugega eksperimenta.....	25
Slika 7: Hitrost respiracije ($\mu\text{l CO}_2/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{suhih tal}}$) v odvisnosti od časa inkubacije.....	26
Slika 8: Elektroforeza v agaroznem gelu iz tal izolirane DNA.....	27
Slika 9: Elektroforeza v agaroznem gelu pomnožkov 1. reakcije vgnezdene PCR.....	28
Slika 10: Elektroforeza v agaroznem gelu pomnožkov 2. reakcije vgnezdene PCR.....	28
Slika 11: Elektroforeza v agaroznem gelu fragmentov 16S rRNA, ki so bili pomnoženi z metodo PCR s padajočo temperaturo prileganja.....	29
Slika 12: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec kontrolnega mikrokozma z netretiranim vzorcem tal.....	30
Slika 13: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec mikrokozma z dodanim 1 % deležem lignina.....	31
Slika 14: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec mikrokozma z dodano ferulično kislino.....	32
Slika 15: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec mikrokozma z dodano ferulično kislino in ligninom.....	32
Slika 16: Fenetsko drevo DGGE profilov lakaznih genov različnih tretmajev na dan priprave mikrokozmov (časovna točka 0).....	33
Slika 17: DGGE profil genov za 16S rRNA.....	34

KAZALO PRILOG

Priloga A: Dodatni testi aktivnosti fenol oksidaz

Priloga A1: Absorbanca raztopine ABTS pri 420 nm v odvisnosti od pH reakcijske mešanice.

Priloga A2: Hitrost anorganske oksidacije ABTS [$\Delta A/h$] v odvisnosti od pH reakcijske mešanice.

Priloga A3: Absorbanca raztopine vzorca tal pri 420 nm v odvisnosti od pH reakcijske mešanice.

Priloga A4: Hitrost spremembe absorbance avtoklaviranih tal v odvisnosti od pH reakcijske mešanice.

Priloga B1: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, A vzorec tal, pH 5,8.

Priloga B2: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, A vzorec tal, pH 7,6.

Priloga B3: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, B vzorec tal, pH 4,0.

Priloga B4: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, B vzorec tal, pH 5,8.

Priloga B5: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, B vzorec tal, pH 7,6.

Priloga B6: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, C vzorec tal, pH 4,0.

Priloga B7: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, C vzorec tal, pH 5,8.

Priloga B8: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, C vzorec tal, pH 7,6.

Priloga B9: Aktivnost fenol oksidaz vzorca tal A pri pH reakcijske mešanice 4,0.

Priloga B10: Aktivnost fenol oksidaz vzorca tal C pri pH reakcijske mešanice 4,0.

Priloga C1: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po dveh dneh inkubacije.

Priloga C2: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po 7 dneh inkubacije.

Priloga C3: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po 14 dneh inkubacije.

Priloga C4: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po 28 dneh inkubacije.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

16S rRNA	ribonukleinska kislina male podenote ribosoma (ang. small subunit ribosomal ribonucleic acid)
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
BLAST	Programsko orodje za primerjavo nukleotidnih ali proteinskih sekvenc (ang: Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
CO₂	Ogljikov dioksid
DGGE	elektroforeza v denaturirajočem gradientu (ang. denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
FA	Ferulična kislina (ang. ferulic acid)
LIG	Lignin
N₂	Dušik (v magistrskem delu označuje mikrokozme, inkubirane v anaerobnih pogojih)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
O₂	Kisik (v magistrskem delu označuje mikrokozme, inkubirane v aerobnih pogojih)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)
WHC	sposobnost zadrževanja vode (ang. water holding capacity)

1 UVOD

Lignin je kompleksen heteropolimer, ki povezuje celulozo in hemicelulozo, kar daje rastlini strukturno trdnost. Razgradnja in odstranjevanje lignina predstavlja oviro tako mikrobom, kot tudi inženirjem v industriji. Razgradnja fenolnih obročev v ligninu je trenutno najboljše proučena pri glivah (Peng in sod., 2008). Bakterijske predstavnike, ki so sposobni razgradnje lignina praviloma najdemo v prebavnem traktu žuželk, ki se hranijo z lesom. Potencial za razgradnjo lignina so zasledili pri predstavnikih iz debela *Alfaproteobakterij*, *Gamaproteobakterij* in *Aktinomicet* (Bugg in sod., 2011), med temi je najboljše opisana razgradnja lignina pri vrsti *Streptomyces viridosporus* (Ramachandra in sod., 1988). Domnevajo tudi, da bi naravno zmožnost razgradnje lignina lahko imele še *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Flavobacterium meningosepticum*, sposoben tvorbe peroksida, ter bakterijski razgrajevalci poliaromatskih ogljikovodikov (DeRito in sod., 2005; Koga in sod., 1999., Peng in sod., 2008).

V svetu trenutno vlada velik interes za proizvodnjo alternativnih biogoriv (Charles, 2009) iz odpadne rastlinske biomase (Blanch in sod., 2008). Lignin, ki predstavlja približno 25 % rastlinske biomase, predstavlja oviro pri razgradnji izhodnega materiala in tako viša ceno ter niža učinkovitost procesov (Wei in sod., 2009). Četudi je v predpripravi večinsko odstranjen, lahko inhibira celulaže v nadaljevanju proizvodnega procesa (Singh in sod., 2009). Lakaze so encimi, ki sodelujejo pri razgradnji lignina in so trenutno že v uporabi v tekstilni industriji ter obdelavi lesne pulpe v papirni industriji (Gamelas in sod., 2005). Zanimiva je tudi uporaba lakaz kot encimov ki modificirajo tarčne spojine in s tem omogočajo na primer vezavo želenih molekul na površino lesa ali tekstila (Crestini in sod., 2010), adsorbirane na podlago pa celo izkazujejo protimikrobno aktivnost tako proti bakterijam, kot tudi glivam (Ibrahim in sod., 2007).

Lakaze lahko imobiliziramo na površino, kar poceni njihovo aplikacijo (Hu in sod., 2007; Rekuć in sod., 2009). S tem jim lahko zvišamo termostabilnosti in na sploh odpornosti na ekstremne pogoje in kemične agense (Arica in sod., 2009), vendar pa lahko imobilizacija tudi zniža aktivnost encima (Hu in sod., 2007). Lakaze so izredno uporabni encimi širokega spektra, vendar imajo trenutno dostopne lakaze tudi številne pomanjkljivosti, kot so slaba aktivnost pri visokih pH vrednostih ter drag proces množične proizvodnje encimov, zato industrija potrebuje nove, bolj učinkovite in na ekstremne okoljske dejavnike odporne lakaze. Bakterije predstavljajo trenutno še slabo raziskan vir novih lakaz. So tudi ključne za razgradnjo organske snovi v tleh in za kroženje ogljika, pri čemer pričakujemo, da lakaze igrajo pomembno vlogo.

1.1 NAMEN DELA

Namen magistrskega dela je bil proučiti vpliv dodatka lignina na spremembe v mikrobni aktivnosti ter strukturi kislih šotnih tal Ljubljanskega barja. Aktivnost celotne združbe smo ocenili z merjenjem respiracije preko produkcijo CO₂, medtem ko smo se pri testu aktivnosti fenol oksidaz osredotočili na del združbe, ki je sposobna razgradnje aromatskih spojin. Spremembe v strukturi mikrobne združbe smo analizirali z metodo gelske elektroforeze z gradientom denaturanta (DGGE) in sicer na nivoju genov za 16S rRNA ter proteobakterijske lakaze.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Predpostavljamo, da bo obogatitev tal z ligninom in/ali ferulično kislino vplivala na aktivnost mikroorganizmov (fenol oksidazno aktivnost, mikrobno respiracijo) in sestavo mikrobne združbe v tleh (na nivoju 16S rRNA ter proteobakterijskih lakaznih genov).
- Predpostavljamo, da bo v anaerobnih tleh aktivnost fenol oksidaz nižja kot v aerobnih tleh.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O LAKAZAH

Lakaze (benzendiol:kisik oksidoreduktaze, EC 1.01.3.2) so oksidaze, ki vsebujejo več bakrovih atomov v aktivnem centru (Hoegger in sod., 2006). Poznamo tri načine delovanja lakaz: (1) prečno povezovanje monomerov, (2) razgradnja polimerov ter (3) cepitev obroča aromatskih spojin (Kawai in sod., 1988).

Lakaze so razširjene v vseh domenah življenja. Pri glivah, kjer so najboljše preučene, jih najdemo v deblih *Ascomycota*, *Basidiomycota* ter *Deuteromycota* (Fungi imperfecti) (Barbosa in sod., 1996). Visoka aktivnost lakaz, ki so razširjene v skoraj vseh glivah bele trohnobe namiguje, da je njihova pomembna naloga razgradnja kompleksnih gradnikov rastlinske celične stene, kot je lignin (De Jong in sod., 1997). Poleg razgradnje biopolimerov, glivne lakaze sodelujejo tudi pri procesih pigmentacije, morfogeneze, detoksifikacije, sporulacije in patogeneze (Nagai in sod., 2003; Thurston, 1994; Langfelder in sod., 2003).

Rastlinske lakaze prav tako opravljajo različne naloge pri rastlinah. Katalizirajo polimerizacijo lignina, celjenje poškodovanega rastlinskega tkiva (McCaig in sod., 2005) in oksidacijo železa s pretvorbo Fe(II) v Fe(III) (Hoopes in Dean, 2004). V obdobju zadnjega desetletja se veliko uporablja transgenske manipulacije za povišano izražanje genov za lakaze v rastlinah. Cilj je uporaba rastlinske biomase za pridobivanje energije, fitoremediacijo ter nadzorovan metabolizem fenolnih spojin (Bailey in sod., 2004).

Znanje o lakazah pri živalih je še vedno pomanjkljivo. Opisana je bila detoksifikacijska aktivnost lakaz v krvožilju vrste komarja *Anopheles gambiae* (Lang in sod., 2012).

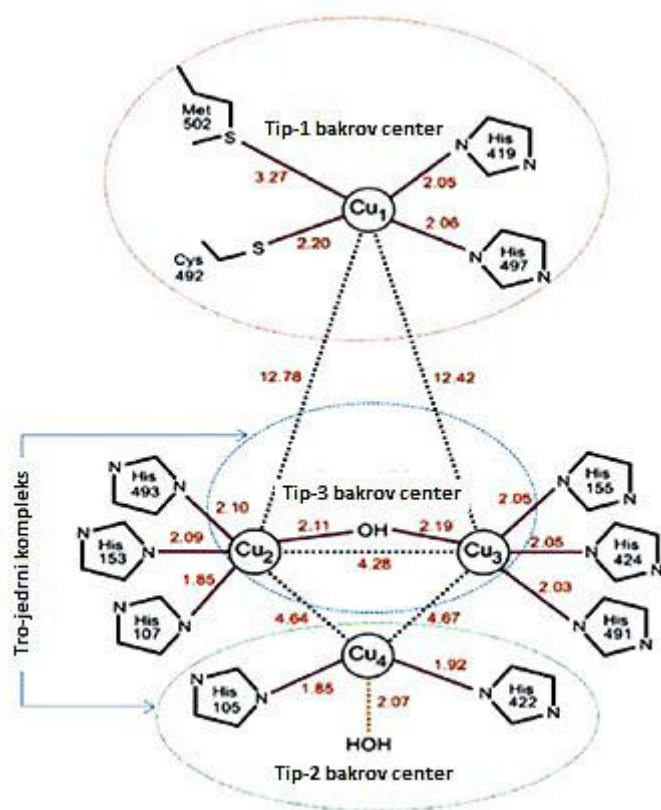
Gene za domnevne lakaze so s sekvenciranjem genomov našli tudi pri različnih skupinah arhej (Sharma in Kuhad, 2009). Med drugim so lakazi iz *Pyrobaculum aerophilum* dokazali redukcijsko aktivnost dušikovega oksida, na podlagi česar sklepajo na vpletenost encima v zadnjem koraku denitrifikacijske poti pri tej arheji (Fernandes in sod., 2010).

Bakterijske lakaze so našli tako pri po Gramu pozitivnih kot negativnih bakterijah. Med prvimi prokariontskimi je bila opisana lakaza iz *Azospirillum lipoferum* (Givaudan in sod., 1993). V deblu aktinobakterij so lakaze dokazali v *Streptomyces griseus* (Freeman in sod., 1993, Endo in sod., 2002), *S. lavendulae* (Suzuki in sod., 2003), *S. coelicolor*, (Machczynski in sod., 2004) ter *S. ipomea* (Molina-Guijarro in sod., 2009). V deblu firmikut so bile opisane lakaze pri *Bacillus sphaericus* (Claus in Filip, 1997), *Bacillus halodurans* (Ruijsenaars in Hartmans, 2004) in pri *Bacillus subtilis* (lakaza CotA) (Hullo in sod., 2001). Na podlagi testov z delečijo CotA vemo, da je ta vpletena v tvorbo pigmenta v plašču spore *Bacillus subtilis* (Hullo in sod., 2001). Nadalje so lakaze našli še pri bakterijah *Marinomonas mediterranea* (Lopez-Serrano in sod., 2007), *Thermus*

thermophilus HB27 (Miyazaki, 2005), *Azospirillum* sp. (Nikitina in sod., 2010), *Ralstonia solanacearum* (Hernandez Romero in sod., 2005) ter nekaterih drugih bakterijah. Metagenomske študije potrjujejo splošno razširjenost lakaz v domeni bakterij. V študiji (Ausec in sod., 2011) so s pregledom 2200 celotnih in delnih genomov našli domnevne gene za lakaze v 21 deblih, v največjem številu v deblih *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* in *Acidobacteria*.

2.2 STRUKTURA LAKAZNIH ENCIMOV

Tro-domenske lakaze so običajno monomeri sestavljeni iz treh kupredoksinjskih domen (glikozilacije ni ali pa je minimalna), medtem ko dvo-domenske lakaze tvorijo homotrimere ali homodimere (Molina-Guijarro in sod., 2009). Za katalitsko aktivnost lakaz so odgovorni bakrovi ioni. Ti so razporejeni v tri centre, ki se ločijo glede na signal elektronske paramagnetne resonance (EPR, *ang. electron paramagnetic resonance*) (Bento in sod., 2006). Tip-1 ali modri bakrov center, tip-2 ali normalni bakrov center ter tip-3 ali dvojedrni bakrov center (Solomon in sod., 1992).



Slika 1: Shematski prikaz lakazne strukture. Označeni so bakrovi centri in interatomske razdalje med pomembnimi ligandi (Dwivedi in sod., 2011).

Center tipa-1 ima trigonalno koordinacijo, ki jo sestavljajo dva histidina in cistein kot ohranjena liganda ter en variabilen ligand. Ta je pri bakterijah navadno metionin, pri glivah

pa fenilalanin ali levcin. Domnevno ravno variabilni ligand v največji meri vpliva na oksidacijski potencial ter mehanizem aktivnosti encima, saj je mutacija fenilalanina v metionin signifikantno zmanjšala oksidacijski potencial lakaze v *Trametes villosa* (Kumar in sod., 2003). Modra barva tip-1 bakrovega centra je posledica intenzivne absorpcije kovalentne vezi baker-cistein pri valovni dolžini 610 nm. Kot liganda v tip-2 bakrovem centru sodelujeta dva histidina ter voda, medtem ko v tip-3 trije histidini ter hidroksilni most, ki vzdržuje močno anti-feromagnetno vezavo med obema bakrovima ionoma v tem centru. Center Tipa-2 ne absorbira svetlobe pri nobeni valovni dolžini in je lociran v neposredni bližini centra tipa-3, ki absorbira svetlobo pri 330 nm (Piontek in sod., 2002).

Glede na strukturo in lastnosti bakrovih centrov ločimo lakaze z nizkim ter visokim redoks potencialom. Medtem ko večino lakaz v glivah bele trohnobe uvrščamo med tiste z visokim redoks potencialom (Gutiérrez in sod., 2006), imajo lakaze rastlin ter bakterij praviloma nižjega (Mikolasch in Schauer, 2009).

2.2.1 Mehanizem delovanja lakaz

Lakaze sklopijo oksidacijo substrata z redukcijo kisika. To jih razlikuje od peroksidaz, ki večinoma lahko oksidirajo podobne substrate, vendar te za delovanje potrebujejo peroksid. Za katalitično aktivnost so odgovorni bakrovi atomi. Lakaza prenese štiri elektrone na kisik, pri čemer nastane molekula vode. Slednje lahko s kemijskega vidika strnemo v tri korake: (1) redukcija bakrovega centra tipa-1 ob oksidaciji substrata, (2) notranji prenos elektronov od centrov tipa-1 do tipa-2 in tipa-3 ter (3) redukcija kisika v vodo v trojdnem kompleksu bakrovih centrov tip-2 in tip-3. Oksidirani substrat lahko kot difuzibilni radikal reagira z molekulami v neposredni bližini (Claus, 2003).

Celokupna kemijska reakcija: $4RH + O_2 \rightarrow 4R^{\cdot} + 2H_2O$

2.2.2 Fizikalne in kemijske lastnosti lakaz

Lakaze so navadno prisotne v različnih izo-encimskih oblikah, ki izkazujejo afiniteto za različne substrate. Poleg mono- in poli-fenolov lahko lakaze oksidirajo različne aromatske spojine, kot so diamini, aromatski amini, tioli ter nekatere neorganske komponente, kot so jodin, $Mo(CN)_8^{4-}$ in $Fe(CN)_6^{4-}$ (Claus in sod., 2003; Baldrian in sod., 2006). Organske substrate lakaz delimo v tri skupine substituiranih molekul s prostim vezavnim parom elektronov, in sicer: (1) orto- (gvajakol, o-fenilenediamin, pirokatehol, dihidroksifenilalanin, kafeična kislina, galna kislina in protokatehuat), (2) meta- (m-fenilenediamin, orcinol, resorcinol in ploroglucinol) ter (3) para- (p-fenilenediamin, p-krezol in hidrokinon). V primeru prisotnih mediatorjev se seznam možnih substratov signifikantno poveča, saj lahko v tem primeru pride do oksidacije tudi kompleksnejših spojin (Call in Mucke, 1997). Med učinkovite mediatorje, ki jih najdemo v naravi, upoštevamo fenol, anilin, 4-hidroksibenzoat in 4-hidroksibenzil alkohol, medtem ko so med sintetičnimi pogosto uporabljata 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)

(ABTS) in 1-hidroksibenzotriazol (HBT) (Johannes in Majcherczyk, 2000). Ti po reakciji oksidacije na lakazi v obliki radikala prosto potujejo ter reagirajo z molekulami v neposredni bližini.

Afiniteta in specifičnost za substrate je odvisna od pH. Za substrate, katerih oksidacija ne vključuje izmenjave protonov (npr. ferocianid), aktivnost lakaz z višanjem pH navadno pade. V primeru izmenjave protonov ob oksidaciji npr. fenola, pa aktivnost lakaz v večji meri narekujejo lastnosti producenta encima kot pa tip substrata (Xu in sod., 1998). Bakterijske in rastlinske lakaze praviloma ostanejo aktivne pri višjih pH, kar lahko na primeru rastlin razložimo z dejstvom, da so encimi locirani znotrajcelično. Glivne lakaze so nasprotno bolj aktivne pri nizkih pH, kar je najverjetneje posledica prilagojenosti življenja v kislih okoljih (Madhavi in sod., 2009).

Temperaturni optimum lakaz se giba na intervalu med 50 °C in 70 °C, vendar je dokumentiranih več encimov, ki so učinkoviti tudi pri nižjih temperaturah (Ko in sod., 2001). Termalna stabilnost encima je običajno pogojena s prilagojenostjo izvornega organizma na visoke temperature, pri čemer imajo glivne lakaze navadno slabšo termostabilnost kot bakterijske (Baldrian, 2006).

Lakaze lahko inhibirajo majhni anioni, npr. halidi, azid, cianid in hidroksid (Xu in sod., 2009). Te snovi domnevno regirajo s tip-2 in tip-3 bakrovim centrom, kar zmoti notranji prenos elektronov in vodi v znižanje encimske aktivnosti. Med inhibitorje upoštevamo tudi kovinske ione (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} in Zn^{2+}), maščobne kisline, hidroksiglicin, kojično kislino, EDTA, L-cistein, glutation, tioureo in nekatere detergente (Baldrian, 2004). Ti naj bi inhibitorno delovali posredno s kelacijo bakrovih ionov, modifikacijo aminokislinskih ostankov ali preko konformacijske spremembe na glikoproteinih (Gianfreda in sod., 1999).

2.2.3 Aplikacije lakaz

Lakaze se uporabljajo pri številnih industrijskih procesih. Prednost pred funkcijsko sorodnimi encimi jim zagotavljata visoka katalitska učinkovitost ter širok spekter substratov. V industriji uporabljajo predvsem lakaze iz gliv, ki so bolje preučene od bakterijskih (Shraddha in sod., 2011). Pri pripravi lakaz uporabljajo več postopkov izolacije in čiščenja:

- kolonska kromatografija, sklopljena z gelsko filtracijo za čiščenje lakaze LLP13 (Kiiskinen in sod., 2004);
- ionsko izmenjevalna kromatografija, sklopljena z gelsko filtracijo za čiščenje lakaze iz glive *Trametes versicolour* (Cordi in sod., 2007);
- celitna kromatografija, sklopljena s 54-kratnim prečiščevanjem lakaze iz glive *Neurospora crassa* (Grotewold in sod., 1998);

- etanolna precipitacija, DEAE-Sepharose, Phenyl-Sepharose in Sephadex G-100 kromatografija za čiščenje lakaze iz *Trametes versicolour* (Hess in sod., 2002).

Industrijski procesi, kjer se trenutno uporablja lakaze, so:

- Razgradnja lignina in beljenje pulpe v papirni industriji, kjer trenutno prevladuje mehansko in kemijsko razbitje rastlinskega materiala. Prednost biološke razgradnje je (1) v manjši količini onesnažil v stranskih produktih v primerjavi s kemijskimi metodami ter (2) končni produkt je čvrstejši kot pri mehanski metodi, saj ne pride do razpada celuloznih in hemiceluloznih vlaken (Gamelas in sod., 2005).
- Bioremediacija, kjer preko oksidativnih reakcij lakaze spreminjajo toksične snovi v netopne komplekse. Predvsem imamo tu v mislih fenole in klorirane fenole (Wang in sod., 2002).
- Sposobnost lakaz, da vzpodbudijo polimerizacijo se uporablja v biosinteznih postopkih kozmetičnih pigmentov, barvil, prehranskih dodatkov ter pesticidov (Jeon in sod., 2011).
- V tekstilni industriji so lakaze uporabne za beljenje bombaža, ker ti postopki v primerjavi z obstoječimi varčujejo z energijo, vodo in kemikalijami (Tzanov in sod., 2003).
- V napitkih, kot so vino, sadni sokovi in piva, številne fenolne spojine (kumarinska kislina, flavani in antociani) povzročajo neželene učinke, kot so razbarvanje, obarjanje ali sprememba okusa (Servili in sod., 2000). Lakaze lahko razgradijo te snovi ter odstranijo raztopljeni kisik iz tekočine (Petersen in sod., 1996).
- Razviti so bili številni biosenzorji z lakazami, s katerimi lahko kvantificiramo glukozo, aromatske amine ali fenolne spojine (Ghindilis in sod., 1995). Ker lakaze neposredno in izključno reducirajo kisik, so to izkoristili za izdelavo biosenzorjev kisika v plinski fazi (Gardioli in sod., 1996).
- Lakaze uporabljajo za sintezo kompleksnih snovi (npr. heterodimernih antibiotikov) s fenolno oksidacijo (Agematu in sod., 1993), oksidativnim parjenjem in nuklearno aminacijo (Mikolasch in sod., 2007). Študije so tudi pokazale, da lakaze, izolirane iz glive *Tricholoma giganteum*, inhibirajo reverzno transkriptazo HIV1 (Wang in Ng, 2004).

2.3 RAZGRADNJA LIGNINA

Lignoceluloza je strukturni material, gradnik rastlinske celične stene, ki predstavlja večino celične biomase. Sestavljena je iz treh komponent in sicer celuloze, hemiceluloze in lignina. Celuloza sestavlja od 30 % do 50 % suhe teže lignoceluloze in je polisaharid, ki ga sestavljajo z β -1,4 vezmi povezane D-glukoze. Hemicelulozo sestavljajo drugi polisaharidi, predvsem ksilani in manani, ki so tesno prepleteni s celuloznimi filamenti in kovalentno povezani z ligninom (Lee, 1997).

Lignin predstavlja od 15 % do 30 % suhe teže lignoceluloze (Faix, 1991). Je kompleksen aromatski heteropolimer, ki ga sestavljajo z različnimi vezmi povezane enote fenilpropanoida aril-C₃. Lignin se tvori z radikalno polimerizacijo enot kumarilalkohola, koniferilalkohola in sinapilalkohola, ki so v ligninih različnih vrst različno zastopani (Faix, 1991). Etrske ter C-C vezi, ki povezujejo te aromatske gradnike lignina, so izredno odporne na razgradnjo, zato preplet ligninskih vlaken in celuloze predstavlja fizično oviro za razgradnjo lignoceluloze. Proces razgradnje je trenutno zelo neučinkovit, kar povzroča izgube v industriji.

In vitro študije na ligninskih modelih, kot na primer študija Buswell in sod. (1995), so pokazale, da se razgradnja z lakazami prične z oksidacijo fenolne hidroksilne skupine, pri čemer nastanejo fenoksi radikali. Ti se nadalje spontano reorganizirajo in zaradi reaktivnosti lahko povzročijo cepitev alkilnih stranskih verig polimera. Lakaze lahko cepijo tako β -1 kot β -O-4 dimere preko C _{α} -C _{β} cepitve, C _{α} oksidacije in alkil-aril cepitve.

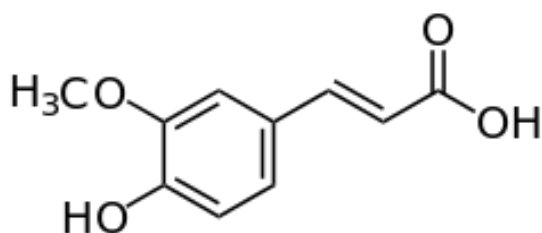
Z lakazami pri procesu razgradnje lignina navadno sinergistično sodelujejo še oksidoreduktaze iz skupine peroksidaz in sicer lignin peroksidaze (LiP), manganove peroksidaze (MnP) ter raznolike peroksidaze (VP, *ang. versatile peroxidase*). LiP razgrajuje ne-fenolne podenote lignina (90 % polimera) medtem ko MnP peroksidaze generirajo Mn³⁺, ki deluje kot difuzibilni mediatorji oksidacije za fenolne ter ne-fenolne podenote lignina. VP so bile odkrite kasneje in kot kaže združujejo katalitske sposobnosti LiP ter MnP (Martinez in sod., 2005). Nekatere študije predpostavljajo, da naj bi bil za proces razgradnje lignina prisotnost manganovih peroksidaz v kombinaciji z lakazami ali lignin peroksidazami minimalni zahtevan encimski kompleks (De Jong in sod., 1992). Znano je, da reakcije oksido-redukcije niso zadostne za razbitje nativne oblike lignina, iz česar sledi, da so v začetni fazi razgradnje potrebni še drugi, neraziskani mehanizmi (Hammel in Cullen, 2008).

Proučevanje bakterijskih razgrajevalcev lignina je še v povojih. V literaturi so trenutno opisane številne streptomicete (Vicuna, 1988), med katerimi je najboljše preučena *Streptomyces viridosporus* T7A (Ramachandra in sod., 1988). Dodatno k razgrajevalcem lignina prištevamo še nekatere vrste *Nocardia* (Zimmermann, 1990), *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6, *Rhodococcus jostii* RHA1 ter *Pseudomonas putida* mt-2 (Masai in

sod., 2007). Medtem ko je aktivnost razgradnje lignina pri *Strptomyces viridosporus* v veliki meri odvisna od prisotnosti peroksida, pri bakterijah *P. putida* in *Rhodococcus* tega ne opazimo. Sledi, da imajo pri slednjih lakaze lahko vidnejšo vlogo, ali pa so te bakterije razvile zunajcelični sistem za generiranje peroksida. Večina do sedaj prepoznanih bakterijskih razgrajevalcev lignina se razvrsti v deblo *Actinomycetes* ter razreda α -*Proteobacteria* in γ -*Proteobacteria*. Ti predstavniki so na splošno najboljše poznani iz študij prebavnega trakta termitov in drugih žuželk, ki se hranijo na lesu (Bugg in sod., 2011).

2.4 FERULIČNA KISLINA

Pri našem poskusu smo kot reprezentativni primer ligninskega monomera uporabili ferulično kislino (FA, *ferulic acid*). Ta je prekurzor pri biosintezi lignina in derivatov cinamata. V rastlinski celični steni ferulična kislina z esterskimi vezmi prečno povezuje hemicelulozna vlakna (Williamson in sod., 1998).



Slika 2: Strukturna formula ferulične kisline (Lu in sod., 2005).

Natančneje sta trenutno opisani dve poti razgradnje ferulične kisline v bakterijah. Prvo pot so opisali pri *S. paucimobilis* SYK-6, kjer encim feruloil CoA sintetaza katalizira pretvorbo ferulične kisline v feruloil CoA. Ta se nadalje pretvori v vanilin in acetil CoA (Masai in sod., 2002). Sorodne gene so našli v *Pseudomonas flourescens* (Gasson in sod., 1998), *Pseudomonas sp* HR199 (Priefert in sod., 1997), *Pseudomonas putida* (Venturi in sod., 1998) in *Amiclatopsis sp.* HR 167 (Achterholt in sod., 2000). Drugo pot razgradnje katalizira monooksidativna dekarboksilaza, pri čemer z odcepom ogljikovega atoma s stranske verige ferulične kisline nastanejo različne 4-vinil aromatske spojine, ki so bile prvič prepoznane v *Bacillus sp.* BP-7 (Prim in sod., 2001). Podobne dekarboksilaze so našli še v *Lactobacillus* (Landete in sod., 2010) in *Enterobacter sp.* Px6-4 (Gu in sod., 2011).

2.5 ZNAČILNOSTI TAL LJUBLJANSKEGA BARJA

Na Ljubljanskem barju ločimo dva osnovna tipa in sicer nizko barje (*ang. fen*) ter visoko barje (*ang. bog*). Nizko barje se napaja s podtalnico in površinskimi vodami, medtem ko visoko barje stika s podtalnico nima. Napaja se izključno s hranili revno padavinsko vodo, kar omogoča rast le izbranega rastlinja. Na visokem barju tako najdemo npr. šotni mah ter sfagnumsko šoto, medtem ko na nizkem barju šoto sestavljajo predvsem ločje in šaši.

Za potrebe naše raziskave smo v letu 2011 vzorčili šotna tla na lokaciji (45°58'N, 14°28'E). Po izsledkih Ausec in sod. (2009) je v zgornji plasti (30 cm globine) $45,4 \pm 0,21$ % organskega ogljika in $2,75 \pm 0,01$ % organskega dušika. Razmerje med ogljikom in dušikom je 17:1. Tla imajo visoko sposobnost zadrževanja vode (WHC). V študijah šotnih tal, med drugim tudi na Ljubljanskem barju (Hacin in sod., 2001; Kraigher in sod., 2006), je bila izmerjena pozitivna korelacija med WHC in vsebnostjo organske snovi.

Ljubljansko barje je pod vplivom celinskega podnebja z izrazitimi letnimi časi in povprečno temperaturo ozračja med 25 °C poleti ter 4 °C pozimi (ARSO, 2013). Padavine so prisotne skozi celo leto z izjemo poletnih mesecev, ko je padavin običajno manj. Poplave, ki lahko prekrijejo do 50 % Ljubljanskega barja, so odvisne od količine padavin v povirjih Ljubljanice in njenih pritokov (Hacin in sod., 2001). Letno v Ljubljanski kotlini pade približno 1800 mm padavin (ARSO, 2013).

Ob razmahu izsuševanja, rezanja šote in poljedelstva so se na Ljubljanskem barju spremenili tudi mnogi zgoraj opisani parametri. Zaradi izkoriščanja šote, uporabe kot goriva in vrtnarskega substrata, visokega barja danes praktično ni več. Vrhnji sloj je zaradi obdelave in osuševalnih del postal bolj prezračen, kar pospeši razgradnjo organske snovi in humifikacijo, ter zmanjšuje WHC. Zaradi izhlapevanja vode je mikrobna aktivnost poleti nižja, vendar v času obilnega deževja še vedno prihaja do poplavljanja. Posledično je vse prisotno življenje izpostavljeno nihajočemu redoks potencialu med prezračenimi pogoji v suši, ter anaerobnimi pogoji, ki nastanejo zaradi poplav ali dvigovanja podtalnice (Kraigher in sod., 2006).

V študiji Ausec in sod., (2009) so s knjižnicami genov za 16S rRNA dokazali visoko raznolikost mikrobne združbe tako v tleh nizkega kot tudi visokega barja. V tleh visokega barja prevladuje deblo *Acidobacteria* (42 %), sledijo α -*Proteobacteria* (15 %) ter v manjšem deležu β - γ - in δ -*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes* ter *Verrucomycrobia*.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 1: Uporabljena laboratorijska oprema.

Oprema	Model	Proizvajalec
Avtoklav	A-21	Kambič, Slovenija
Aparat za PCR	Biometra TProfessional Standard	Biometra, Nemčija
Brezprašna komora	AHC-2D	ESCO, ZDA
Centrifuga	5424	Eppendorf, Nemčija
Instrument za elektroforezo	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, ZDA
Instrument za DGGE	Bio-Rad Protean II	Bio-Rad, ZDA
Napajalnik za elektroforezo	Biometra Standard Power Pack P25	Biometra, Nemčija
Tehtnica	AY612	Sartorius, Nemčija
UV-VIS spektrofotometer	NanoDrop 1000	Thermo Scientific, ZDA

Preglednica 2: Uporabljeni laboratorijski pripomočki.

Pripomoček	Proizvajalec
Avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
Glavnički za elektroforezo	Bio-Rad, ZDA
Glavnički za DGGE	Bio-Rad, ZDA
Merilni valji	Kartell, Italija
Mikrocentrifugirke	Brand, Nemčija
Mikrotitrne plošče	Brand, Nemčija
Multikanalna pipeta	Brand, Nemčija
Nastavki za pipete	Sarstedt, Nemčija

3.1.2 Kemikalije in kompleti za izolacijo ter čiščenje DNA

Preglednica 3: Uporabljeni reagenti.

Reagent	Založna koncentracija
Agaroza	/
Akrilamid	40 %
APS	10 %
BSA	10 mg/ml
DNA nanašalni pufer	6 x
DNA lestvica: Gene Ruler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, ZDA)	0,1 µg/µl
DNA polimeraza: <i>Taq</i> DNA Polymerase (Promega, ZDA)	5 u/µl
Etanol	70 %, 96 %
Etidijev bromid	10 mg/l
Formamid	100 %
Mešanica dNTPs	10 mM
MgCl ₂	25 mM
Pufer za PCR	5 x
Sybr Safe (Life Technologies)	10 000 x
TEMED	99 %
Voda: destilirana (dH ₂ O), MiliQ (MQ)	/

Komercialno dostopni kompleti, ki so bili uporabljeni za izolacijo DNA ter čiščenje PCR produktov:

- Komplet za izolacijo celokupne DNA (PowerSoil[®] DNA Isolation Kit; MoBio, ZDA)
- Komplet za čiščenje produktov PCR (QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen, ZDA)

3.1.3 Pufri in raztopine

Preglednica 4: Tris-acetatni pufer za elektroforezo (TAE), 50X.

Tris – base	242 g
Ledocetna kislina	57,1 mL
0,5 M EDTA (pH 8)	100 mL
dH ₂ O	do 1000 mL

Preglednica 5: Receptura za pripravo založnih raztopin 8 % akrilamidnega gela z 0 % oziroma 80 % vsebnostjo kombinacije denaturantov formamida in uree.

	0 % denaturanta	80 % denaturanta
Založni 40 % akrilamid	20 mL	20 mL
50X TAE pufer (tris, acetat, EDTA)	2 mL	2 mL
Urea	/	33,6 g
Formamid	/	32 mL
Destilirana voda	Do skupno 100 mL	Do skupno 100 mL

3.1.4 PCR začetni oligonukleotidi

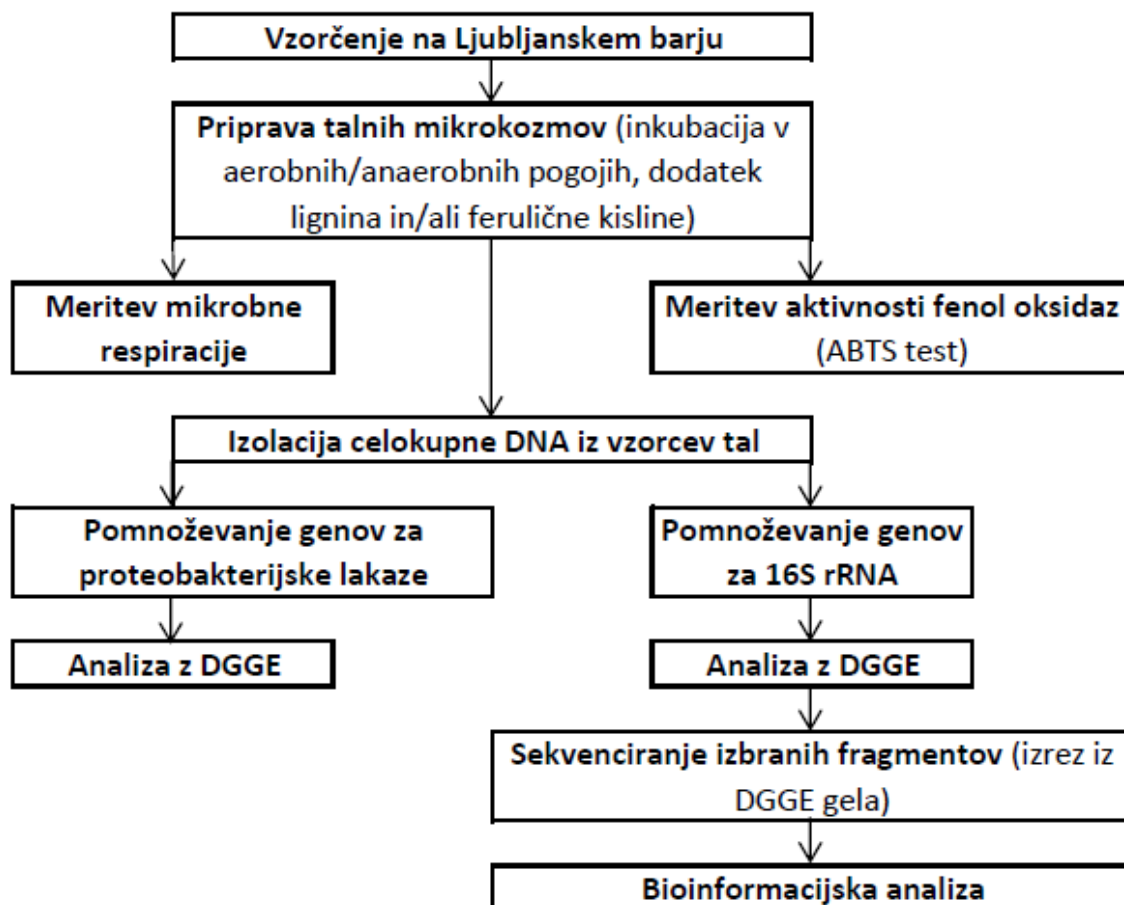
Preglednica 6: Začetni oligonukleotidi, ki so bili uporabljeni v raziskovalnem delu.

Gen, ki kodira	Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje (5'→ 3')	Referenca
16S rRNA (V3 regija)	357F - GC	[CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGGCACGGGGGG]CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer in sod., 1993
	517R	ATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer in sod., 1993
Bakterijske lakaze	Cu1AF	ACMWCBGTYCAYTGGCAYGG	Kellner in sod., 2008
	Cu4R	TGCTCVAGBAKRTGGCAGTG	Ausec in sod., 2011
Lakaze proteobakterij	Cu1AF-GC	[CGCCCCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGGCACGGGGGG]ACMWCBGTYCAYTGGCAYGG	Ausec in sod., 2011
	Cu2R	GRCTGTGGTACCAGAANGTNCC	Kellner in sod., 2008

3.2 METODE

V okviru magistrske naloge smo v vzorcih tal Ljubljanskega barja proučevali aktivnost fenol oksidaz ter spreminjanje mikrobne združbe v talnih mikrokozmi na podlagi DGGE analize genov za proteobakterijske lakaze in 16S rRNA. Delo je ločeno v dva eksperimenta. Za vsakega izmed dveh so bila tla ločeno vzorčena (za potrebe prvega eksperimenta julija 2011, za potrebe drugega pa septembra 2011), poleg tega pa se med

eksperimentoma razlikuje tudi metodologija. Zaradi lažje sledljivosti so te razlike poudarjene le, ko je to vsebinsko pomembno.



Slika 3: Hodogram eksperimenta.

3.2.1 Vzorčenje

Vzorčenje tal je potekalo ločeno za vsak eksperiment in sicer v juliju in septembru 2011 na Ljubljanskem barju v Kozlarjevem gozdu (45°58'N, 14°28'E). Za to področje so značilna tla visokega barja z visoko vsebnostjo organske snovi. S preprostim nastavkom za izdelovanje vrtin smo do globine 30 cm z eno vrtino nabrali približno 250 g tal, skupno približno 3 kg. Za potrebe prvega eksperimenta smo vzorčili na treh mestih, ki so bila med seboj oddaljena do 4 metre. Vzorce smo označili s črkami A, B in C. Vzorec A je bil odvzet na potki, kjer ni bilo vegetacije, medtem ko sta bila vzorca B in C odvzeta na travnatih mestih. Pri drugem eksperimentu so bile vse vrtine narejene v radiju enega metra ter skupno homogenizirane v enoten vzorec.

3.2.2 Karakterizacija tal

Vzorcem tal smo izmerili pH, vlažnost, sposobnost za zadrževanje vode (ang. *water holding capacity*, *WHC*) ter izračunali delež maksimalne vsebnosti vode.

3.2.2.1 pH

Za meritev pH smo pripravili raztopino tal in dH₂O v razmerju 1:1 ter raztopino pomerili s pH metrom (WTW Electrode SenTix 81).

3.2.2.2 Vlažnost

Vlažnost predstavlja količnik med maso vode ter maso suhega vzorca in je izražena v [g_{vode}/g_{suhih tal}]. Suho težo smo stehali po 24 urnem sušenju v pečici na 105 °C, maso vode pa izračunali z razliko med vzorcem ter njegovo suho težo.

3.2.2.3 WHC (sposobnost za zadrževanje vode)

Za določitev WHC smo uporabil cilindre (premer 53 mm, volumen 100 cm³), ki smo jih do polovice napolnili z vzorcem tal. Na spodnjem delu cilindra je fiksirana porozna tkanina, ki zadržuje tla, ne pa vode. Vzorce smo najprej z namakanjem v destilirani H₂O nasičili z vodo (3 h) ter nato pustili, da se odvečna voda odcedi do konstantne teže (5-6 h). Vzorce smo nato posušili v peči (24 h, 105 °C). Vrednosti smo izračunali po enačbi 1.

$$WHC = \frac{((CV_n - C_n) - (CV_p - C_p))}{(CV_p - C_p)} [g(vode)/g(suhih tal)] \quad \dots(1)$$

Oznaka **CV** pomeni maso cilindra z vzorcem, **C** pa maso samega cilindra. Podpisan **n** označuje vzorce nasičene z vodo, **p** pa posušene v pečici.

3.2.2.4 Delež WHC

Delež WHC smo izračunali tako, da smo delili vlažnost vzorca tal z WHC in je predstavljen v odstotkih. Pove nam kolikšen delež zadrževalne kapacitete za vodo je trenutno izkoriščen. V naših poskusih smo delež WHC v vseh mikrokozmi z dodatkom ustrezne količine destilirane vode izenačili na 60 %, s čimer smo želeli izenačiti količino dostopne vode, saj ta vpliva na biokemijske procese v tleh.

3.2.3 Priprava mikrokozmov

Vzorci tal so bili homogenizirani skozi sito (velikost lukenj 8 x 8 mm). Mikrokozme smo pripravili v 250 mL stekleničkah, v katere smo natehtali 150 g tal.

Pri prvem eksperimentu smo pripravili 4 tretmaje, vsakega v ponovitvah z vzorci tal A, B in C, skupno 12 mikrokozmov:

- vzorec tal, inkubacija v aerobnih pogojih;
- vzorec tal z dodanim 1 % masnim deležem alkali lignina (Sigma-Aldrich), inkubacija v aerobnih pogojih;
- vzorec tal, inkubacija v anaerobnih pogojih;
- vzorec tal z dodanim 1 % masnim deležem alkali lignina (Sigma-Aldrich), inkubacija v anaerobnih pogojih.

Vse mikrokozme smo z ustrezno količino dodane destilirane H₂O umerili na 70 % delež WHC. Pri tretmajih z anaerobno inkubacijo smo atmosfero zamenjali z dušikom. V mikrokozmi smo s črpalko najprej vzpostavili podtlak ter nato prepihali z dušikom. Postopek smo ponovili trikrat.

Pri drugem eksperimentu smo prav tako pripravili 4 tretmaje v treh bioloških ponovitvah, skupno 12 mikrokozmov:

- Vzorec tal
- Vzorec tal z dodanim 1 % masnim deležem lignina. V drugem eksperimentu smo namesto alkali lignina uporabili zmleto prhko lesovino, ki je bila razgrajena z glivami rjave trohnobe (pridobljeno na Oddelku za lesarstvo, prof. Franc Pohleven). 1 % masni delež smo izračunali na podlagi izsledkov študije Li in sod. (2011), kjer so po 15 dneh razgradnje lesa z glivami rjave trohnobe izmerili cca. 70 % vsebnost lignina.
- Vzorec tal z dodano ferulično kislino - FA (100 µmol FA/g_{suhih tal})
- Vzorec tal z dodanim 1 % masnim deležem lignina in 100 µmol FA/g_{suhih tal}

Pri drugem eksperimentu so bili vsi mikrokozmi inkubirani v aerobnih pogojih, ki smo jih vzdrževali z rednim prepihovanjem zračne faze mikrokozma ob hkratnem mešanju vzorca tal.

3.2.4 Aktivnost fenol oksidaz

Za oceno aktivnosti fenol oksidaz v tleh smo izvajali metodo, prirejeno po Floch in sod. (2007), pri kateri smo uporabili 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) (ABTS) kot substrat za fenol oksidaze. Vzorec smo za analizo pripravili tako, da smo 2,5 g tal raztopili v 22,5 mL 0,9 % raztopine NaCl, ter stresali (1 h, 150 rpm). 11 mL smo nato prenesli v 15 mililitrske falkonke, ter stresali 15 min s steklenimi kroglicami (premer 2mm). V mikrotiterskih ploščah smo pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala 130 µL fosfat acetatnega pufra (pH 4,9, 5,8 in 7,6), 50 µL raztopine ABTS (20 mM) in 20 µL vzorca homogeniziranih tal. Mikrotiterske plošče smo stresali (1 h, 50 rpm), nato centrifugirali (3000 rpm, 4 min, 4 °C), 100 µL supernatanta prenesli na novo ploščo ter izmerili absorbanco pri 420 nm. Kot negativno kontrolo za oceno nebiološke razgradnje ABTS smo uporabili avtoklavirane vzorce tal (30 min, 121 °C), ki smo jih tretirali po enakem postopku.

Opravili smo tudi vrsto vzporednih poskusov, s katerimi smo želeli oceniti vpliv različnih dejavnikov na meritve aktivnosti fenol oksidaz. Preverili smo vpliv dolžine avtoklaviranja na meritve negativne kontrole tako, da smo vzorec avtoklavirali pol, eno in dve uri pri 121 °C. Nadalje smo v pH razponu od 2,5 do 8,0 izmerili vpliv pH na meritve ter kinetiko meritev v časovnem intervalu ene ure (30 meritev v razmiku dveh minut). Slednje meritve smo izvedli za vodno raztopino tal in vodno raztopino ABTS. Pri prvi smo želeli preveriti vpliv pH na vzorec tal, pri drugi pa smo želeli oceniti abiotsko oksidacijo ABTS.

3.2.5 Merjenje CO₂ v plinski fazi mikrokozma

Merjenje je potekalo na plinskem kromatografu (Hewlett Peckard 5890), na katerem smo iz vsakega mikrokozma analiziral 250 µL plinske faze. S plinskim kromatografom smo izvedli šest serij meritev v času inkubacije 11 dni. Ob vsaki časovni meritvi smo opravili različno število meritev (od 2 do 6) na vzorec v različnih časovnih presledkih, skupno 24 ur.

Pomemben dejavnik pri zagotavljanju konstantnih meritev je način prepihanja pred začetkom meritve. Zaradi Le Chatellierovega principa se vzdržuje ravnovesje med raztopljenim in prostim CO₂, posledično smo zato pri površnem prepihanju dobili relativno visoke začetne meritve. Te smo med računalniško obdelavo standardizirali v isto izhodiščno točko. Mikrokozme smo najprej prezračevali zgolj z odpiranjem steklenic in rahlim pretresanjem vsebine. Kasneje smo zaradi zgoraj omenjenih razlogov prepihovali temeljiteje in sicer tako, da smo mikrokozme najprej 6 minut vakumirali ter nato z zračnim curkom prepihovali. Za vsako prepihanje smo postopek izvedli dvakrat.

3.2.6 Izolacija DNA

DNA smo iz tal izolirali s kompletom PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) ter se držali priloženega protokola proizvajalca. Uspešnost izolacije smo preverjali s spektrofotometrom (Thermo Scientific, NanoDrop 1000 spektrofotometer). Izolirano DNA smo shranjevali na -80 °C.

3.2.7 Pomnoževanje fragmentov genov za lakaze

Za pomnožitev sekvenc genov za bakterijske lakaze smo uporabili metodo vgnezdene PCR. Postopek smo izvajali na PCR napravi TProfessional (Biometra). V prvi reakciji (Preglednica 7) smo uporabili začetne oligonukleotide Cu1AF (Kellner in sod., 2008) ter Cu4R (Ausec in sod., 2011). Ti pomnožujejo regijo med prvo in četrto baker vezavno regijo domnevnih genov za lakaze. V drugi reakciji (Preglednica 8) vgnezdene PCR pa smo uporabili set začetnih oligonukleotidov GC-Cu1AF-prot ter Cu2R-prot (Ausec in sod., neobjavljeno). Ti pomnožujejo regijo med prvo in drugo baker vezavno regijo domnevnih proteobakterijskih genov za lakaze. Forward začetnim oligonukleotidom (GC-Cu1AF-prot pri pomnoževanju genov za lakaze ter 357f-GC pri pomnoževanju genov za 16S rRNA) so dodane GC čeljusti. To so daljša zaporedja (v našem primeru 39bp) GC baznih parov, ki se med potekom DGGE ne razklenijo, njihov namen pa je natančnejša ločba fragmentov v vzorcu. V spodnjih preglednicah so navedeni protokoli in recepti za posamezne PCR reakcije.

Preglednica 7: Prva vgnezdene PCR reakcija za pomnoževanje daljših fragmentov genov za lakaze.

1 µL DNA template	94 °C	5'	
1x PCR pufer	94 °C	30"	
1,5 mM MgCl ₂	48 °C	30"	25X
0,8 mg/mL BSA	72 °C	60"	
0,2 mM dNTP	72 °C	5'	
1 µM Cu1AF ¹			
1 µM Cu4R ²			
0,04 U/µL polimeraze			
miliQ voda do 25 µL			

¹Cu1AF (5'-ACM WCB GTY CAY TGG CAY GG-3') (Kellner in sod., 2008)

²Cu4R (5'- TGC TCV AGB AKR TGG CAG TG -3') (Ausec in sod., 2011)

Preglednica 8: Druga vgnezdna PCR reakcija za pomnoževanje kratkih fragmentov genov za lakaze.

2 µL DNA template	94 °C	3'	
1x PCR pufer	94 °C	1'	
1,5 mM MgCl ₂	57 °C	1'	35X
0,5 mg/mL BSA	72 °C	30"	
0,2 mM dNTP	72 °C	5'	
0,5 µM GC-Cu1AF-prot ¹			
0,5 µM Cu2R-prot ²			
0,04 U/µL polimeraze			
miliQ voda do 50 µL			

¹ GC-Cu1AF-prot (5'- ATCCACTGGCACGG-3'), GC-clamp (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCACGG GGG G-3') (Ausec in sod., 2011)

² Cu2R-prot (5'-TAC CAG TAG GTG CC-3')(Ausec in sod., 2011)

3.2.8 Pomnoževanje fragmentov 16S rRNA

Za pomnoževanje 16S rRNA regije smo uporabili protokol prirejen po Muyzer in sod. (1993), pri čemer smo zaradi prisotnih inhibitorjev za večji izkupiček uporabili PCR s padajočo temperaturo prileganja (ang. *touchdown PCR*). Slednja v prvi fazi dvajsetih ciklov pomnoževanja uporablja standardno temperaturo naleganja začetnih oligonukleotidov (65 °C), medtem ko se v drugi fazi desetih ciklov pomnoževanja ta temperatura postopoma spušča na 55 °C (Preglednica 9).

Preglednica 9: PCR s padajočo temperaturo prileganja za pomnoževanje ohranjene regije 16S rRNA.

1 µL DNA template	94 °C	5'	
1x PCR pufer	94 °C	30"	
1,5 mM MgCl ₂	65 °C	30"	20X
1 % formamid	72 °C	60"	
0,2 mM dNTP	94 °C	30"	
0,5 µM 357f-GC ¹	55 °C	30"	10X
0,5 µM 517r ²	72 °C	60"	
0,025 U/µL polimeraze	72 °C	5'	
miliQ voda do 25 µL			

¹357f-GC (5' -CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG- 3')(Muyzer in sod., 2003)

²517r (5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG- 3') (Muyzer in sod., 2003)

Uspešnost pomnoževanja smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (1,6 % agarozni gel). DNA v gelu smo barvali z etidijevim bromidom.

3.2.9 Gelska elektroforeza z gradientom denuranta (DGGE)

Pri DGGE smo uporabili 8 % akrilamidne gele, v katerih smo vzpostavili gradient od 40 % do 60 % denuranta iz založnih raztopin 0 % in 80 %. Denurant v našem primeru predstavljata formamid in urea. Polimerizacija akrilamidnega gela je potekala z dodatkom amonijevega persulfata in TEMED-a (N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin). Prvi kot donor sulfatnih ionov povzroči nastanek radikalov akrilamida, ki se nato povezujejo v nastajajoči polimer, drugi pa reakcijo katalizira. DGGE je potekal 16 h pod električno napetostjo 70V. Po končani elektroforezi smo gele pobarvali tako, da smo jih prelili s 15 µL raztopine 1X TAE pufra s 1,5 µL barvila Syber Safe (Life Technologies).

Slike gelov smo obdelali v programu Bionumerics. Distančna matrika profilov je bila izračunana s Pearsonovim korelacijskim koeficientom, fenetska drevesa pa izrisana po algoritmu UPGMA (Michener in Sokal, 1957). Ocena zanesljivosti vozlišča je bila izračunana po Bootstrap metodi (N=100).

3.2.9.1 Izrez lis iz DGGE gela ter sekvenciranje

Z namenom, da pridobimo iz DGGE gela čim bolj čist fragment, smo izrezovanje izvedli dvakrat. Iz izrezanega koščka gela smo DNA izločili tako, da smo v epico dodali elucijski pufer iz kita za koncentriranje in prečiščevanje PCR produktov (PureLink™, Invitrogen, Life Technologies) ter pustili čez noč, da DNA pasivno iz gela preide v pufer. Po prvem izrezu smo ponovili PCR protokol za pomnožitev 16S rRNA fragmentov, ter ponovno iz DGGE gela izrezali ustrezeni fragment. Ta korak je nujen, ker so zaradi komplementarnega parjenja pomnožkov manjšini prisotni tudi pomnožki iz začetne reakcije PCR.

Za namen sekvenciranja smo število ciklov za pomnoževanje 16S rRNA genov zmanjšali na obeh stopnjah pomnoževanja in sicer za štiri cikle v prvi fazi in dva cikla v drugi fazi. Skupno smo za PCR pomnoževanje uporabili 24 namesto 30 ciklov.

PCR produkt smo prečistili ter koncentrirali s kitom (PureLink™, Invitrogen, Life Technologies) do končnega volumna 30 µL in količino prečiščenega produkta PCR določil spektrofotometrično (Thermo Scientific, NanoDrop 1000 spektrofotometer). Gene smo sekvencirali po Sangerjevi metodi (Macrogen Inc., Nizozemska) z začetnim oligonukleotom 357f-GC. Dobljene sekvence smo poravnali v programu MEGA 5.0 (Tamura in sod., 2011) z algoritmom Muscle. Od začetnega dela zaporedij smo odrezali GC čeljusti, od končnega pa nekakovostno poravnani del. 149bp dolge končne poravnave smo posamično analizirali z orodjem BLASTx (NCBI, 2013) (Altschul in sod., 1990), od koder smo nato na podlagi E vrednosti določili najverjetnejši izvor naše sekvence. E vrednost je merilo za ujemanje preiskovane sekvence z deponiranimi sekvencami v bazi podatkov (Enačba 2). Kakovost ujemanja se manjša s tem ko se E vrednost približuje 1.

$$E = Kmne^{-\lambda S} \quad \dots(2)$$

V enačbi (2) sta **K** in **λ** konstanti, **m** in **n** dolžini sekvenc, ki ju primerjamo ter **S** ocena prileganja zaporedja danih sekvenc.

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI PREUČEVANIH TALNIH VZORCEV

V šotnih tleh smo izmerili značilno nizek pH, ki glede na mesto vzorčenja variira med 3,9 in 4,7 (Preglednica 10). Rezultati WHC se ujemajo z dosedanjimi študijami (Ausec in sod., 2009). Razlike v pH (od 3,9 do 4,7) in WHC (od $6,17 \pm 0,10$ do $7,68 \pm 0,20$) med vzorci A, B, C so sicer majhne a opazne in kažejo na heterogenost tega področja. Ta je najverjetneje odvisna od lokalne strukture tal in vegetacije. Delež WHC lahko variira tudi zaradi dejavnikov, kot je zunanja temperatura, tlak, količina padavin. Na podlagi razmerja C:N, ki je približno 17:1 (Preglednica 11) sklepamo, da naš vzorec tal poleg šote vsebuje tudi precejšnjo količino delno ali popolnoma razgrajene organske snovi.

Preglednica 10: Lastnosti vzorcev tal, vzorčenih v Kozlarjevem gozdu ($45^{\circ}58'N$, $14^{\circ}28'E$). Meritve so bile opravljene na dan vzorčenja.

	Prvi eksperiment			Drugi eksperiment	
	Vzorec A	Vzorec B	Vzorec C	Vzorec D	Vzorec D + LIGNIN (1 %)
pH	3,9	4,7	4,1	$3,75 \pm 0,01$	$3,74 \pm 0,01$
WHC [g_{vode}/g_{suhih tal}]	$6,17 \pm 0,10$	$7,25 \pm 0,18$	$7,68 \pm 0,20$	$7,32 \pm 0,10$	$7,17 \pm 0,15$
Vegetacija	Pot v gozdu	Gozd, trava, šotni mah	Gozd, trava, šotni mah	Potka v gozdu	Potka v gozdu
Čas vzorčenja	Julij 2011	Julij 2011	Julij 2011	September 2011	September 2011

Preglednica 11: Karakterizacija tal, ki so bila v septembru 2008 vzorčena na istem področju kot naši vzorci in sicer za potrebe študije Ausec in sod. (2009).

	Vzorec tal iz študije Ausec in sod. (2009)
Vsebnost organskega ogljika [%]	$45,4 \pm 0,1$
Vsebnost organskega dušika [%]	$2,75 \pm 0,01$
Gostota tal [g cm⁻³]	$0,16 \pm 0,03$

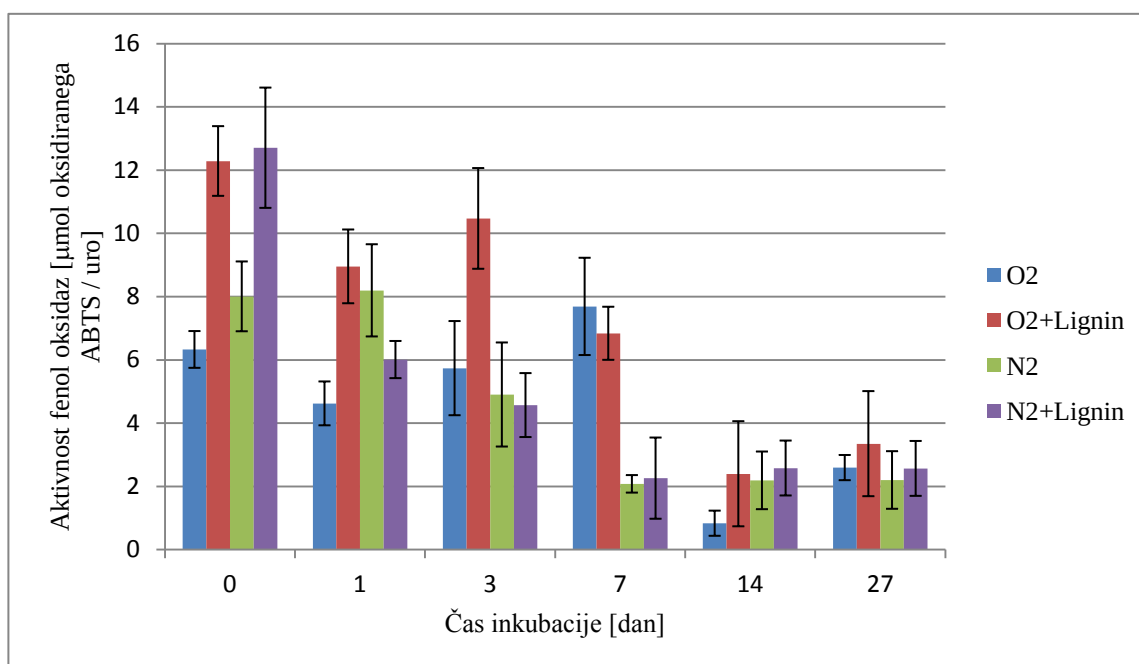
4.2 AKTIVNOST FENOL OKSIDAZ

Aktivnost fenol oksidaz smo merili s testom razgradnje substrata ABTS, prirejeno po Floch in sod. (2007). Predpostavili smo, da bo v primeru dodanega lignina po določenem času inkubacije ta postal ključen substrat za tiste organizme, ki ga lahko uporabijo kot vir energije. Ker je sinteza fenol oksidaz lahko tudi odziv na pomanjkanje hranil (Bumpus in Steven, 1987), mora prej poteči razgradnja lažje dostopnih substratov, da lahko pride do indukcije teh encimov. Na podlagi izsledkov DeAngelis in sod. (2011) smo pričakovali porast aktivnosti fenol oksidaz po približno sedmih dneh inkubacije.

4.2.1 Aktivnost fenol oksidaz pri prvem eksperimentu (vzorci tal A, B, C)

4.2.1.1 Vpliv dodatka alkali lignina na aktivnost fenol oksidaz

Na grafu (Slika 4) je predstavljena aktivnost fenol oksidaz talnega vzorca A pri pH reakcijske mešanice 4,0. Ostali rezultati, ki zajemajo vzorca B in C, so zaradi preglednosti prikazani v prilogah (Priloga B5 - B12). Pokazali smo, da dodatek lignina značilno poviša aktivnosti fenol oksidaz v prvi meritveni točki (dan 0) v primerjavi s kontrolami (brez dodanega lignina) v vseh treh pH pogojih izvajanja poskusa (pH 4,0, 5,8, 7,6) ($p < 0,01$), izjema je le vzorec C pri pH reakcijske mešanice 4,0 (Priloga B6).

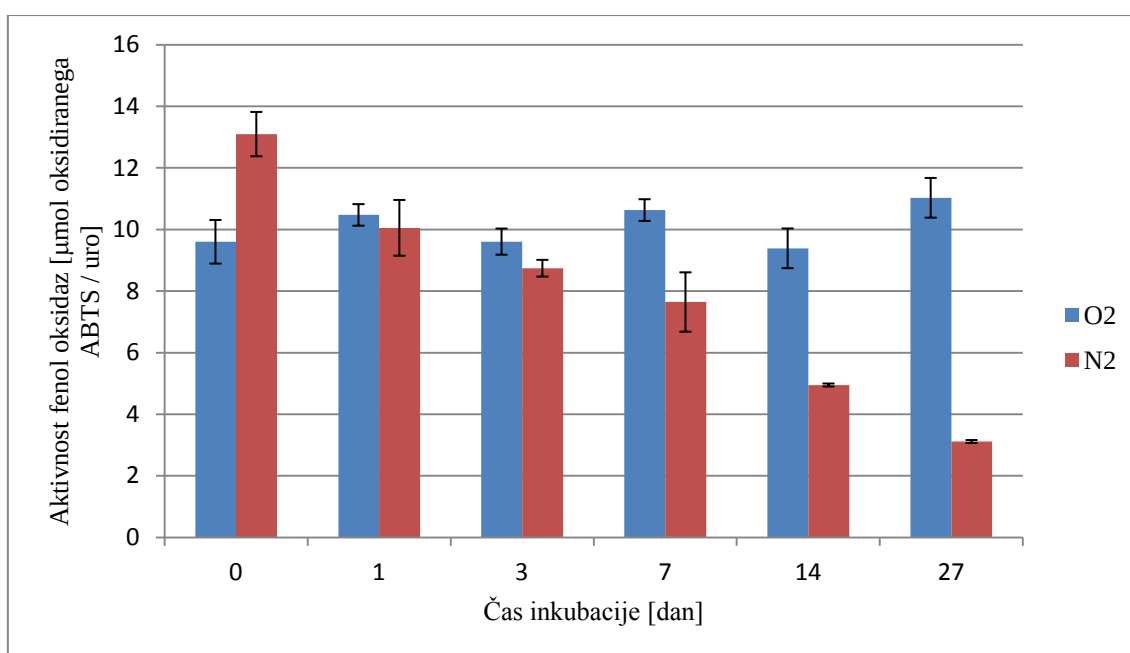


Slika 4: Aktivnost fenol oksidaz vzorca tal A pri pH reakcijske mešanice 4,0. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O2) ali anaerobno (N2) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka (N=3).

Trend povišane aktivnosti fenol oksidaz ob dodatku alkali lignina (Sigma-Aldrich) ni bil opisan v nobeni dosedanji študiji. Ker povišana aktivnost po dnevu inkubacije izgine, smo pojav pripisali prisotnosti lahko razgradljivih monomerov v založnem ligninu, kar je potrdila tudi analiza s FTIR spektroskopijo (Maja Vaukner, Oddelek za lesarstvo, osebna komunikacija) (Rezultati niso prikazani).

4.2.1.2 Primerjava aerobno ter anaerobno inkubiranih vzorcev tal

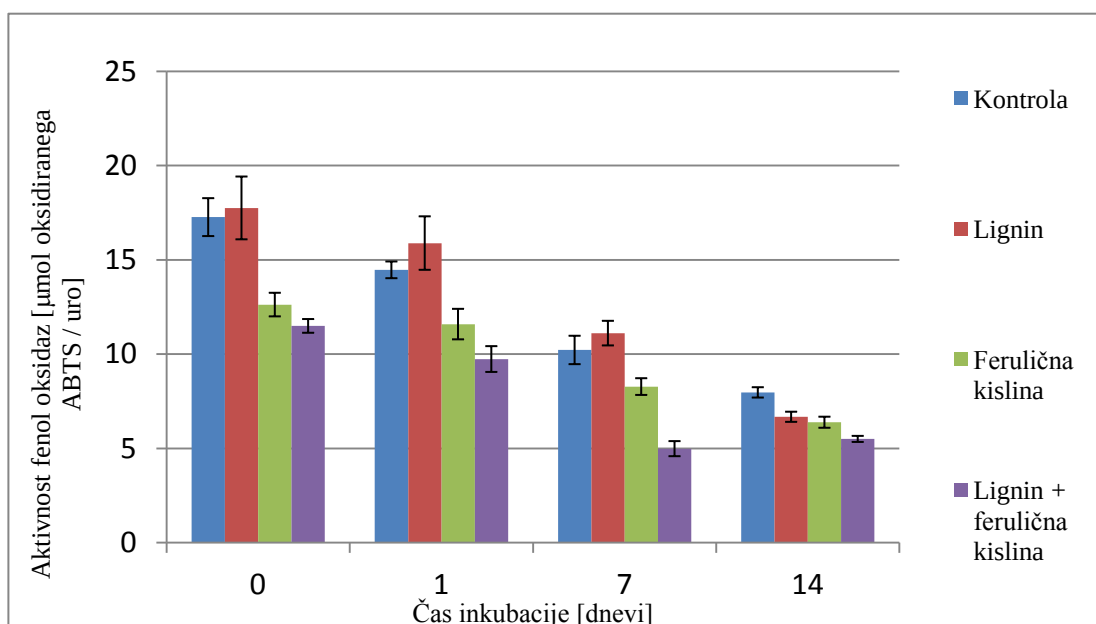
Dokazali smo povišano aktivnost fenol oksidaz v primeru aerobne inkubacije v primerjavi z anaerobno pri vzorcu B (Slika 5), kjer se aerobno mikrokozmi ločijo od anaerobnih po tednu inkubacije ($p < 0,01$) ter vzorcu C (Priloga B10), pri katerem se ločijo po 14-ih dneh ($p < 0,01$). Pri vzorcu A tega trenda nismo zaznali (Priloga B9). Omenjeni trend je opazen le pri pH 4,0, kar je bil poleg še nekaterih kasneje naštetih razlogov tudi povod, da smo nadaljnje eksperimente izvedli zgolj pri tem pH reakcijske mešanice.



Slika 5: Aktivnost fenol oksidaz vzorca tal B pri pH reakcijske mešanice 4,0. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O₂) ali anaerobno (N₂). Predstavljena so povprečja in standardna napaka (N=3).

4.2.2 Aktivnost fenol oksidaz pri drugem eksperimentu (vzorec tal D)

Pokazali smo, da v nasprotju s alkali ligninom (Sigma-Aldrich), dodatek lignina v obliki prhke lesovine, razgrajene s glivami rjave trohnobe, ne povzroči povišane aktivnosti fenol oksidaz v prvi točki merjenja ($p > 0,8$). Vrednosti se pri vseh tretmajih tekom inkubacije nižajo od povprečne vrednosti 15 μmol oksidirane ABTS na dan v časovni točki 0 pa do 7 μmol oksidirane ABTS na dan v časovni točki 14. Do vključno sedmega dne inkubacije opazimo signifikantno nižjo aktivnost fenol oksidaz pri vzorcih z dodano ferulično kislino v primerjavi z tistimi brez ($p < 0,01$). Čeprav je ferulična kislina dobro preučen monomer lignina (Zhou in Wu, 2012; Narbad in Gasson, 1998; Blum 1998), do sedaj še ni bila opisana inhibitorna aktivnost proti fenol oksidazam. Ravno nasprotno mnoge študije dokazujejo stimulatorni vpliv FA na aktivnost fenol oksidaz (Farnet in sod., 2004; Revankar in Lele, 2006).

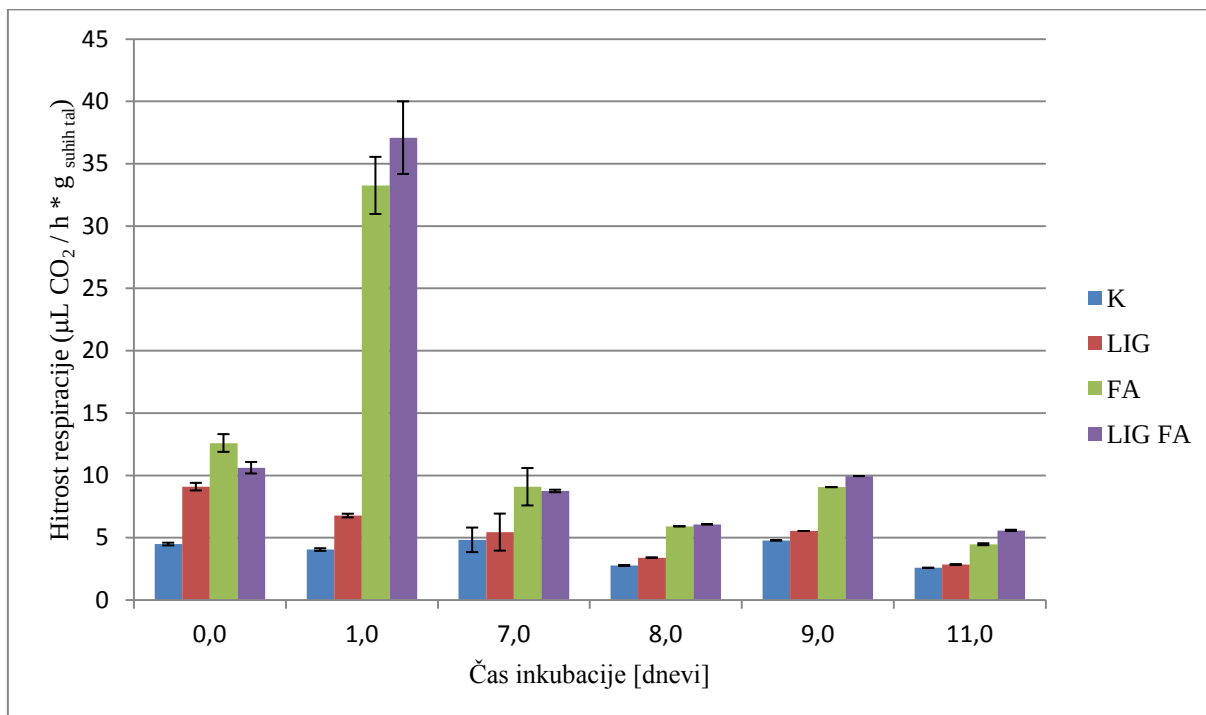


Slika 6: Aktivnost fenol oksidaz v okviru drugega eksperimenta. Oznake vzorcev so sledeče: Kontrola - vzorec tal iz netretiranega mikrokozma, Ligin - vzorec tal z dodanim 1 % masnim deležem lignina, Ferulična kislina - vzorec tal z dodano ferulično kislino (100 μmol ferulične kisline/g suhih tal), Lignin + Ferulična kislina - vzorec tal z dodanim ligninom in ferulično kislino v zgoraj navedenih koncentracijah. Testi so bili izvedeni pri pH reakcijske mešanice 4,0. Predstavljena so povprečja in standardna napaka (N=3).

Meritve fenol oksidazne aktivnosti smo izvajali zgolj pri pH 4,0. Ta pH se najbolj ujemata z značilnostmi vzorčenih tal, poleg tega pa smo z dodatnimi testi potrdili, da pri pH 4,0 napake meritev najmanjše ter edino tu opazimo trend povišane aktivnosti v aerobno inkubiranih vzorcih (Slika 5).

4.3 DELEŽ CO_2 V PLINSKI FAZI MIKROKOZMOV

Pokazali smo, da hitrost respiracije poraste tako ob dodatku lignina, kar se kaže v prvih dveh časovnih točkah predvsem pri tretmajih brez dodane ferulične kisline, kot tudi ob dodatku ferulične kisline, kar je najočitnejše v drugi časovni točki (Slika 7).

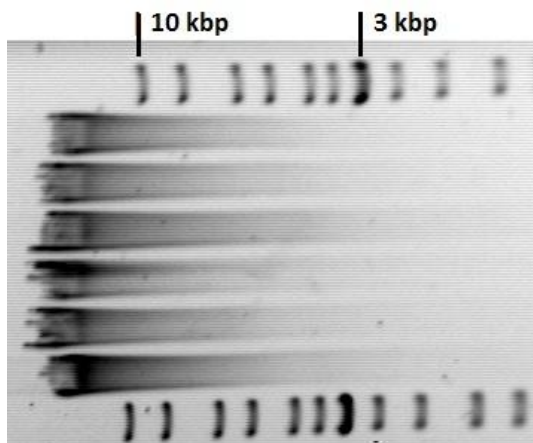


Slika 7: Hitrost respiracije ($\mu\text{L CO}_2/\text{h} \cdot \text{g suhih tal}$) v odvisnosti od časa inkubacije. Oznake vzorcev so sledeče: K - mikrokozem z netretiranim vzorcem tal, LIG - vzorec tal z dodanim 1 % masnim deležem lignina, FA - vzorec tal z dodano ferulično kislino ($100 \mu\text{mol}_{\text{ferulične kisline}}/\text{g suhih tal}$), LIG FA - vzorec tal z dodanim ligninom in ferulično kislino v zgoraj navedenih koncentracijah. Hitrost respiracije je bila izračunana kot naklon linearne regresije meritev deleža CO_2 v eni seriji. Predstavljene so povprečne vrednosti ter njihove standardne napake ($N=3$).

Na grafu (Slika 7) lahko vidimo, da se štiri tretmaji dosledno ločijo v dve skupini, in sicer na tiste z dodano ferulično kislino (FA in LIG FA) ter brez (K in LIG) ($p < 0,01$). Nihanje vrednosti para tretmajev brez dodane ferulične kisline je v rangi napake plinskega kromatografa in je lahko posledica spreminjanja bazne linije naprave. Med seboj se različi z ali brez dodanega lignina v prvih dveh časovnih točkah značilno razlikujeta ($p < 0,01$), skozi nadaljnji potek meritev pa izenačita ($p > 0,70$). Vrednosti pri različicah FA ter LIG FA dosežejo vrh po enem dnevu inkubacije, se do sedmega dneva spustijo do povprečne konstantne vrednosti $7 \mu\text{L CO}_2/\text{h} \cdot \text{g suhih tal}$, ter se nadalje bistveno ne spreminjajo. Med seboj se značilno ne razlikujeta ($p > 0,80$). Ta porast respiracije po dnevu inkubacije pripisujemo stimulaciji mikrobne združbe ob dodatku lahko razgradljive ferulične kisline, ki pa se v aktivnosti fenol oksidaz ne odraža (Slika 6).

4.4 IZOLACIJA DNA

Po izolaciji smo koncentracijo izolirane DNA določili s spektrofotometrom (Thermo Scientific, NanoDrop 1000 spektrofotometer) ter v elucijskem pufru namerili od 30ng/μL do 60 ng/μL nukleinskih kislin z vrednostjo parametra 260/280 na intervalu od 1,7 do 1,9 ter vrednostjo parametra 260/230 na intervalu od 1,6 do 1,9. Če je vzorec odstopal od zgoraj navedenih parametrov, smo izolacijo ponovili.

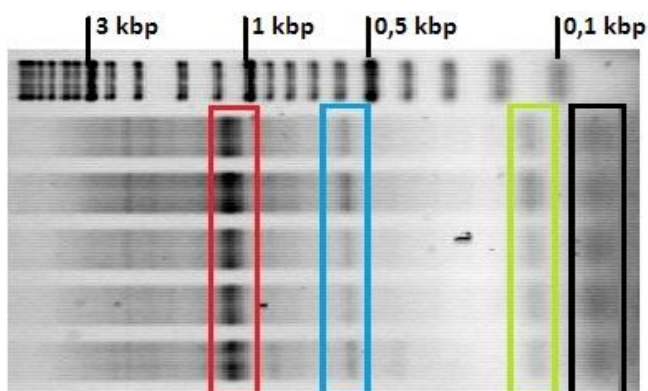


Slika 8: Elektroforeza v agaroznem gelu iz tal izolirane DNA. Na sliki so prikazani naključno izbrani vzorci, ki so reprezentativni tudi za ostale izolacije. V zgornji in spodnji vrstici se nahaja lestvica (GeneRuler DNA Ladder, Thermo Scientific).

Na sliki agarozne gelske elektroforeze je nekaj naključno izbranih vzorcev izolacije DNA iz vzorcev tal. Na slikah ostalih izolacij smo videli lise podobne jakosti. Izolirana DNA večinoma vsebuje fragmente nad 10kbp ter krajše fragmente (razpotegnjena lisa) velikosti do približno 3kbp.

4.5 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO (PCR)

Uspešnost pomnoževanja smo preverili z ločbo na agaroznem gelu (Slika 9, 10 in 11). Postopek nam poleg potrditve, da smo dobili produkt prave velikosti, ponudi tudi grobo oceno količine pomnožka.



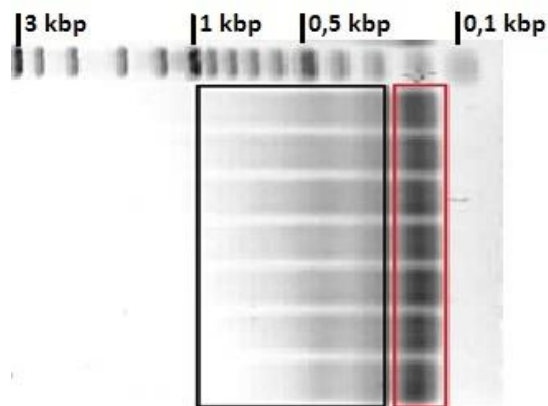
Slika 9: Elektroforeza v agaroznem gelu pomnožkov prve reakcije vgnezdene PCR. Označeni so: rdeč okvir - fragment gena za lakaze med cbr1 in cbr4 dolžine 1200bp, ki nosi zapis za tro-domenske lakaze; moder okvir - fragment gena za dvo domenske lakaze med cbr1 in cbr4 regijo (600bp); zelen okvir – nespecifičen fragment dolžine 150bp; črn okvir - ostanek začetnih oligonukleotidov.

Na sliki elektroforeze v agaroznem gelu (Slika 9) vidimo štiri lise prve PCR reakcije. Par degeneriranih oligonukleotidnih začetnikov (Cu1AF, Cu4R) praviloma pomnoži regijo med prvo in četrto baker vezavno regijo domnevnih genov za lakaze. Ker se ta regija razlikuje med dvo in trodomenskimi lakazami, ustreza fragment velikosti približno 600bp (modri okvir) genom dvodomenskih, drugi fragment dolžine približno 1200bp pa genom trodomenskih lakaz (rdeči okvir). V zelenem okvirju je označen približno 150 bp dolg fragment, ki je v tej reakciji nespecifičen produkt. V črnem okvirju je označen ostanek začetnih oligonukleotidov, ki so reakciji dodani v prebitku.



Slika 10: Elektroforeza v agaroznem gelu pomnožkov druge reakcije vgnezdene PCR. Označeni so: rdeč okvir - fragment gena za lakaze med cbr1 in cbr2 dolžine približno 150bp, črn okvir - ostanek začetnih oligonukleotidov.

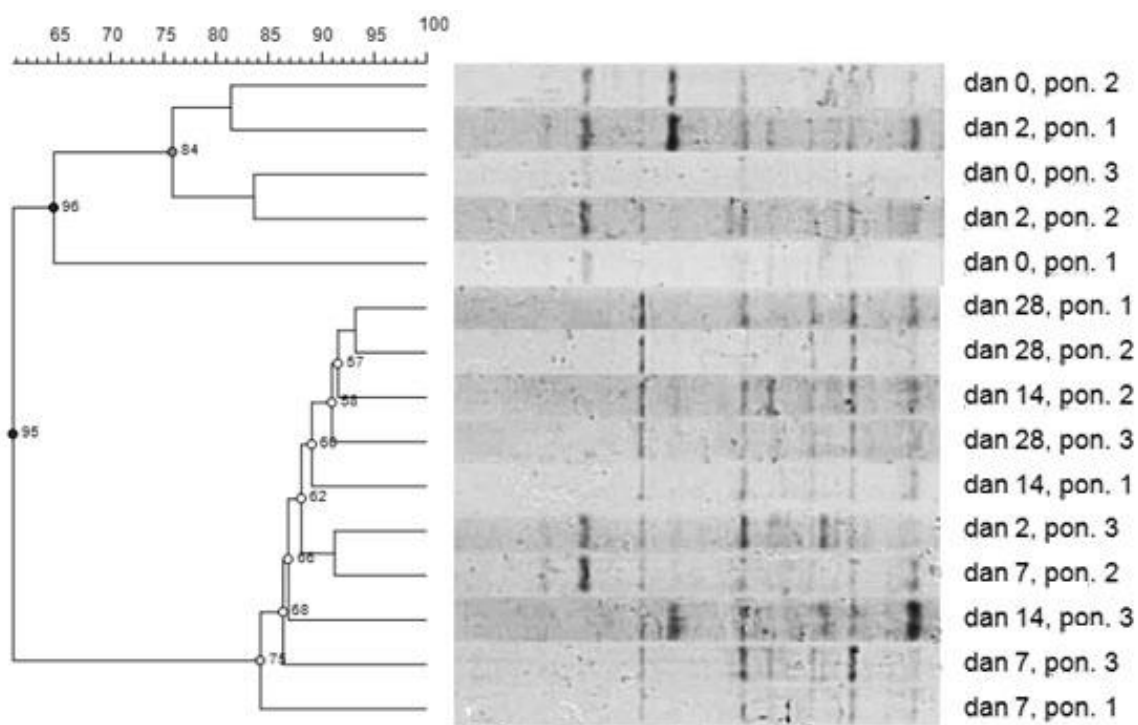
Na sliki elektroforeze v agaroznem gelu druge reakcije vgnezdene PCR (Slika 10) lahko ločimo pričakovan produkt dolžine približno 150bp (rdeči okvir). To je regija med prvo in drugo baker vezavno regijo domnevnih genov za lakaze. Na območju približno 250bp velikih fragmentov je prisotna manjša količina nespecifičnega produkta, medtem ko je v črnem okvirju zopet označen ostanek začetnih oligonukleotidov.



Slika 11: Elektroforeza v agaroznem gelu fragmentov 16S rRNA, ki so bili pomnoženi z metodo PCR s padajočo temperaturo prileganja. Označeni so: rdeč okvir - specifičen produkt dolžine 200bp, črn okvir - lisa nespecifičnih produktov različno velikih fragmentov.

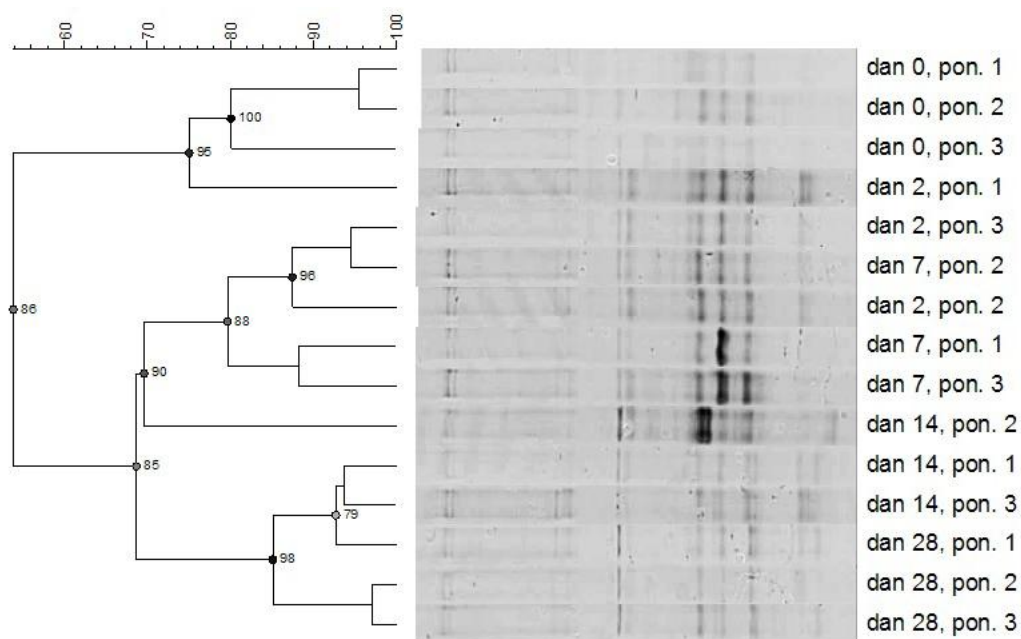
4.6 LOČEVANJE GENOV ZA LAKAZE Z ELEKTROFOREZO Z GRADIENTOM DENATURANTA (DGGE)

Z metodo DGGE smo pokazali, da se profili vseh tretmajev po času spreminjajo, kar je razvidno iz fenetskih dreves (Slika 12-15), kjer se biološke ponovitve istih časovnih točk dosledno združujejo v ločene skupine. Z računalniško združitvijo profilov različnih tretmajev v isti časovni točki smo pokazali, da primerjalna analiza med geli ni mogoča, saj se že v prvi časovni točki, ko pričakujemo podobne profile, ti značilno razlikujejo (Slika 16).



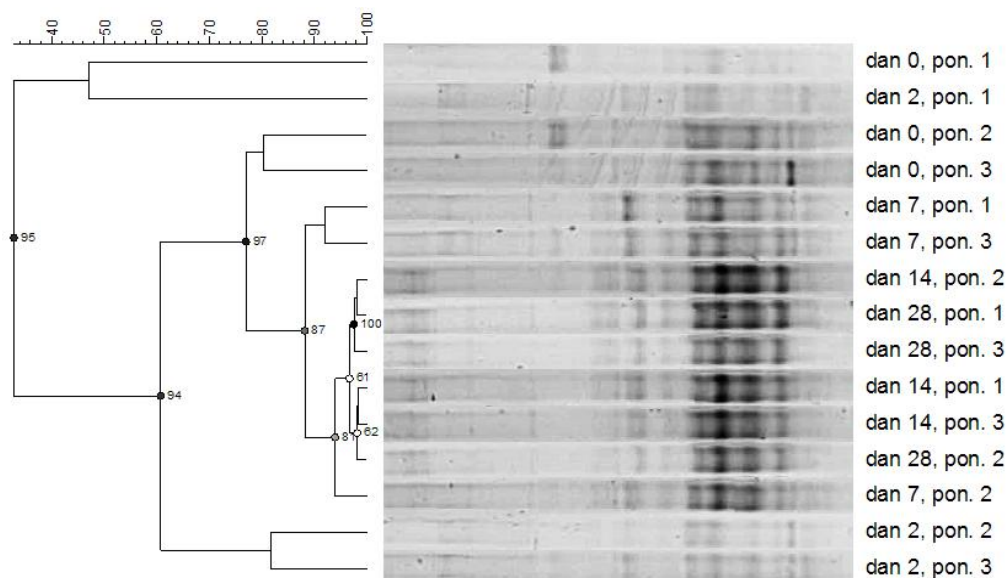
Slika 12: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec kontrolnega mikrokozma z netretiranim vzorcem tal. Ime vzorca nam pove čas inkubacije v dneh ter zaporedno številko biološke ponovitve. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.

Na sliki 12, ki prikazuje časovno spreminjanje profila genov za lakaze v kontrolnih mikrokozmih, se z izjemo vzorca (dan 2, pon. 3) vzorci inkubirani dlje od dveh dni ločijo od ostalih (vrednost metode vezanja 95 %). Ponovitve časovnih točk 7, 14 in 28 so si med seboj zelo podobne. Na to nakazujejo tako nizke vrednosti metode vezanja, ki so med 57 % in 75 %, kot tudi pozna razvejitev.



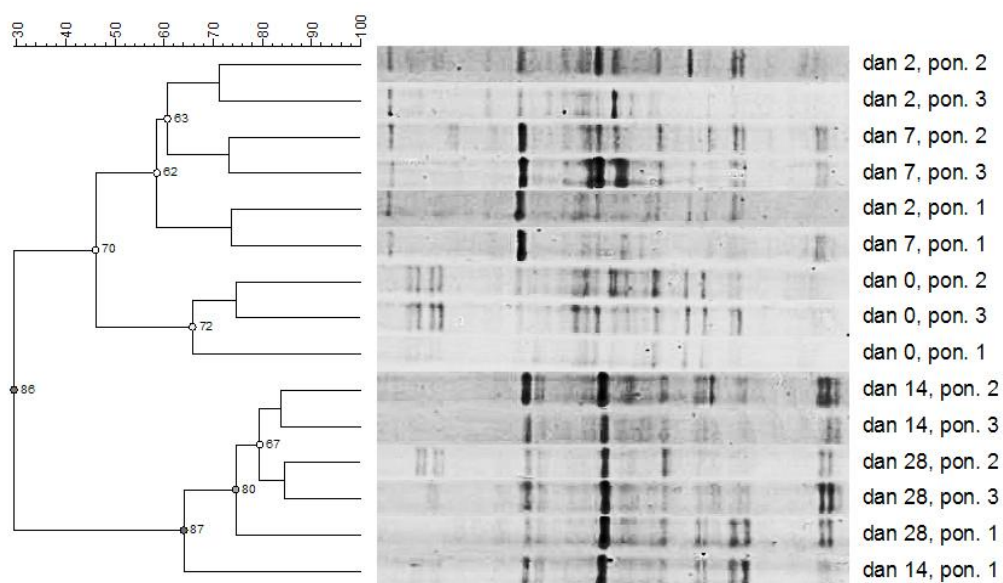
Slika 13: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec mikrokozma z dodanim 1 % deležem lignina. Ime vzorca nam pove čas inkubacije v dneh ter zaporedno številko biološke ponovitve. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.

Slika 13 prikazuje časovno spreminjanje profila genov za lakaze v mikrokozmih z dodanim ligninom. Na drevesu se izoblikujejo tri skupine (vrednost metode vezanja vozlišč je 85 % in 86 %). V prvi skupini so vse ponovitve časovne točke 0 in vzorec (Dan 2, pon. 1). V tretji skupini so vzorci iz časovnih točk 14 in 28 z izjemo vzorca (Dan 14, pon. 2), ki pa se od vseh ostalih na drevesu močno razlikuje (približno 70 % podobnost glede na Pearsonov koeficient). V drugo skupino so se uvrstili vzorci časovnih točk 7, 2 brez (Dan 2, pon.1) ter vzorec (Dan 14, pon. 2). Za razliko od slike 12, vidimo, da so si na podlagi dolžine vej vzorci tu bolj različni.



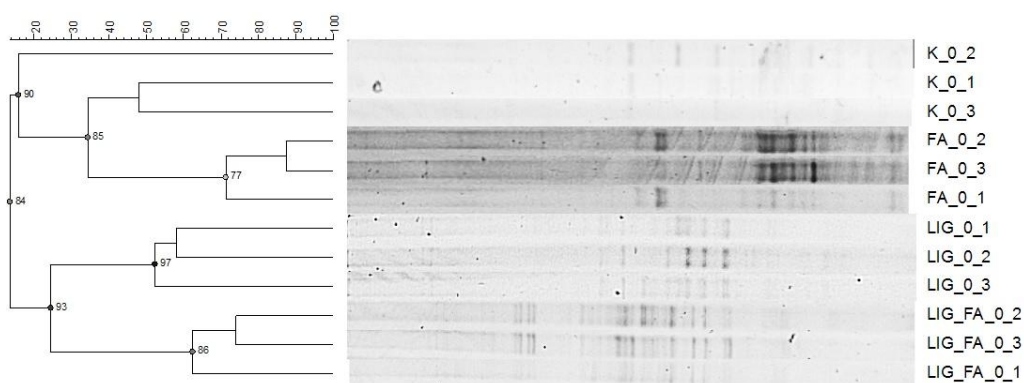
Slika 14: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec mikrokozma z dodano ferulično kislino (100 $\mu\text{mol/g}$ suhih tal). Ime vzorca nam pove čas inkubacije v dneh ter zaporedno številko biološke ponovitve. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.

Na sliki 16, ki predstavlja rezultate mikrokozmov z dodano ferulično kislino, lahko že na podlagi DGGE profilov vidimo, da je kvaliteta rezultatov vprašljiva. Lise so na gelu slabo ločene in niso ostre, med njimi pa so opazne sence, ki motijo računalniško analizo. Vzorci časovnih točk od 7- do 28 so si med sabo bolj podobni, kot so podobni profilom v času nič in 2 dneva inkubacije.



Slika 15: Fenetsko drevo DGGE profilov za vzorec mikrokozma z dodano ferulično kislino in ligninom. Ime vzorca nam pove čas inkubacije v dneh ter zaporedno številko biološke ponovitve. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.

Slika 15 prikazuje rezultate za mikrokozme, v katere smo dodali tako lignin kot ferulično kislino. Na drevesu se dosledno ločijo vzorci časovnih točk 0, 2 in 7 od vzorcev časovnih točk 14 in 28. Vendar je tu potrebno vzeti v obzir dejstvo, da so si posamezni profili tu znatno bolj različni kot na ostalih gelih. Slednje potrjuje tudi slika profilov, na kateri vidimo v prvi vrsti večje število lis kot tudi njihovo dinamiko (pojavljanje, izginjanje) v primerjavi z ostalimi tretmaji. Podobno kot na sliki 13 in 14, lahko tudi tu vidimo, da se vzorci časovne točke 0 praviloma ločijo od ostalih, medtem ko so vzorci časovnih točk 2 in 7 pomešani med sabo.

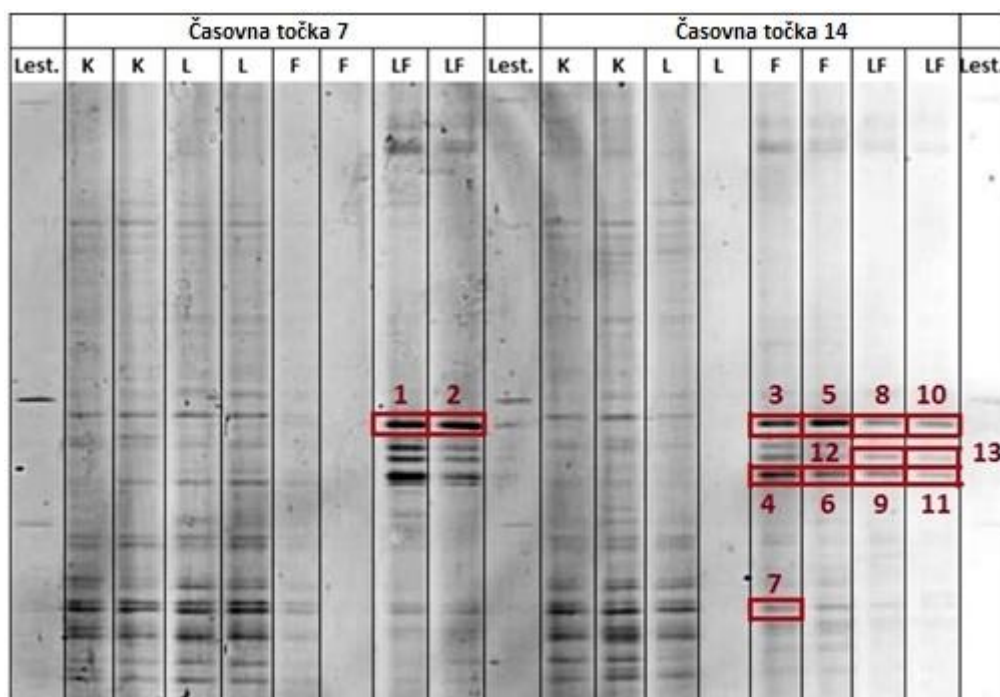


Slika 16: Fenetsko drevo DGGE profilov lakaznih genov različnih tretmajev na dan priprave mikrokozmov (časovna točka 0). Slika ni prikaz enotnega DGGE gela, ampak so bili profili različnih tretmajev združeni programsko. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.

Med delom z DGGE metodo v sklopu tako prvega kot drugega eksperimenta smo prišli do zaključka, da je smiselna zgolj primerjava profilov na istem gelu. To smo potrdili na sliki 16, na kateri smo programsko združili profile različnih tretmajev iz različnih DGGE gelov, katerih vzorci so bili odvzeti na dan priprave mikrokozmov (časovna točka 0). Kot je iz slike razvidno, so velike razlike vidne že v času, ko inkubacija še ni vplivala na prisotno združbo in bi zato pričakovali primerljive profile. Iz predstavljenih rezultatov sklepamo na slabo ponovljivost metode DGGE za analizo genov za lakaze proteobakterij. Med primerljivo analizo poznejših časovnih točk (Priloge C15-C18) je opazen trend vedno jasnejšega ločevanja med tretmaji, kar nakazuje na vpliv dodatka lignina in/ali ferulične kisline na prisotno združbo. Za trdnejše zaključke bi morali pridobiti več med seboj primerljivih profilov, kar pa nam v tem magistrskem delu ni uspelo doseči.

4.7 ELEKTROFOREZA Z GRADIENTOM DENATURANTA (DGGE) S 16S rRNA GENI

Pri analizi genov za 16s rRNA (Slika 17) smo opazili, da se s sedmim dnem inkubacije na novo pojavijo ali močno ojačijo nekatere lise pri vzorcih z dodano ferulično kislino in ligninom. Vzrok, da jih ne vidimo v vzorcih, ki jim je dodana le FA v časovni točki 7 dni je najverjetneje posledica slabega pomnoževanja, saj smo v ponovitvah istega testa lahko zaznali lise (rezultati niso prikazani). Zanimive lise smo izrezali (na sliki označene z rdečimi okvirji in oštevilčene), komercialno sekvencirali ter analizirali z metodo BLASTx (NCBI, 2013).



Slika 17: DGGE profil genov za 16S rRNA. Vzorci so razporejeni v dve skupini glede na čas inkubacije mikrokozmov (7 in 14 dni) ter glede na tretma (K- kontrola, L - dodan lignin, F - dodana ferulična kislina in LF - dodana ferulična kislina in lignin). Vsak tretma je bil izveden v dveh bioloških ponovitvah, ki so nanesene na gel sosedno. Lest. - lestvica.

4.7.1 Sekvenciranje izrezanih lis

Zaporedna številka sekvence (preglednica 11) ustreza številki na DGGE gelu (slika 17). Najsorodnejše zaporedje je bilo izbrano na podlagi E vrednosti. Zadetke sekvenc, ki izhajajo iz sevov, ki jih še niso vzgajali v laboratoriju, smo zanemarili. Accession number je številka dostopa do dotične sekvence v bazi GenBank (NCBI, 2013).

Vse pridobljene sekvence z visokimi ocenami ujemanja pripadajo vrstam iz rodu *Burkholderia*, z izjemo sekvence pod zaporedno št. 7, pri kateri sekvenciranje ni uspelo in zato ni vključena v preglednico.

Preglednica 12: BLASTx (NCBI, 2013) analiza sekvenc genov za 16S rRNA, ki so bili izrezani iz DGGE gela.

Št.	Zadelek v bioinformacijskem orodju BLAST (NCBI, 2013)	Pokritost sekvence	E vrednost	Ujem. sekv.	Accession number
1	<i>Burkholderia</i> sp. DM-Zn1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97 %	9e-70	99 %	gi 89741434 DQ419960.1
2	<i>Burkholderia</i> sp. 2As partial 16S rRNA gene, isolate 2As	97 %	2e-70	99 %	gi 133921341 AM503077.1
3	<i>Burkholderia</i> sp. 2As partial 16S rRNA gene, isolate 2As	100 %	3e-51	92 %	gi 133921341 AM503077.1
4	<i>Burkholderia</i> sp. Ellin187 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100 %	1e-54	93 %	gi 33309429 AF409029.1
5	<i>Burkholderia</i> sp. 2As partial 16S rRNA gene, isolate 2As	100 %	5e-68	99 %	gi 133921341 AM503077.1
6	<i>Burkholderia</i> sp. Ellin187 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97 %	2e-34	85 %	gi 33309429 AF409029.1
8	<i>Burkholderia</i> sp. MAC25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100 %	8e-63	97 %	gi 304653701 HM587748.1
9	<i>Burkholderia</i> sp. Ellin187 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97 %	1e-28	84 %	gi 33309429 AF409029.1
10	<i>Burkholderia</i> sp. YA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	100 %	2e-45	90 %	gi 345651461 JF763861.1
11	<i>Burkholderia phenazinium</i> partial 16S rRNA gene, strain 2Sm91	100 %	4e-32	86 %	gi 109659418 AM268222.1
12	<i>Burkholderia ambifaria</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	97 %	2e-23	81 %	gi 300681902 AB568316.1
13	<i>Burkholderia ambifaria</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	97 %	2e-23	81 %	gi 300681902 AB568316.1

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V raziskovalnem delu smo želeli preveriti vpliv dodanega lignina na aktivnost fenol oksidaz v izbranih šotnih tleh ter z molekularnimi pristopi raziskati vpliv dodatka lignina ali/in ferulične kisline v tla na sestavo genov za bakterijske lakaze in sestavo bakterijske združbe. Tla bogata z organsko snovjo in nizkim pH smo vzorčili v Kozlarjevem gozdu Ljubljanskega barja (Ausec in sod, 2009). Primerljivo študijo bogatenja tal z ligninom, ki nam je služila kot iztočnica, so izvedli tudi DeAngelis in sod. (2011). Ti avtorji so z alkali ligninom obogatili porozne kroglice, ki so jih nato inkubirali v gozdnih tleh. Po 30 dneh so v kroglicah obogatenih z ligninom v primerjavi s kontrolami opazili postopno povišanje aktivnosti fenol oksidaz (test razgradnje L-dihidroksi-fenilalanina). Poleg tega so pokazali, da se je po dodatku alkali lignina pestrost genov za 16S rRNA povišala. Zaključili so, da dodatek lignina stimulatorno vpliva na pestrost bakterijske združbe. Naša študija je potrdila nekatere izsledke iz študije DeAngelis in sod. (2011). Dodatek lignina na primer tekom inkubacije vpliva tako na aktivnost fenol oksidaz kot tudi profil genov za lakaze in 16S rRNA, vendar predvsem v primeru DGGE profiliranja ne vedno na stimulatoren način.

V našem raziskovalnem projektu smo vrednotili:

- celokupno aktivnost fenol oksidaz v tleh s testom razgradnje ABTS, prirejeno po Floch in sod. (2007);
- aktivnost mikrobne združbe preko merjenja respiracije z določanjem deleža CO₂ v plinski fazi mikrokozmov;
- z metodo elektroforeze z gradientom denaturanta v gelu (DGGE) smo v talnih mikrokozmi spremljali spremembe v profilu genov za lakaze proteobakterij ter DGGE profile genov za 16S rRNA.

V dveh zaporednih eksperimentih smo z naštetimi testi preverili:

- vpliv inkubacije tal v oksičnih in anoksičnih pogojih na aktivnost fenol oksidaz;
- vpliv dodanega alkali lignina (prvi eksperiment) ter lignina v obliki prhke lesovine, razgrajene z glivami rjave trohnobe (drugi eksperiment). V obeh primerih je bil lignin dodan vzorcu tal v 1 % masnem deležu;
- vpliv ferulične kisline, ki smo jo dodali v koncentraciji 100 µmol na gram suhih tal
- vpliv ferulične kisline in lignina

5.1.1 Aktivnost fenol oksidaz

Trenutno še ne poznamo specifičnega testa za merjenje aktivnosti lakaz, temveč je mogoče meriti le aktivnost fenol oksidaz. Ker ne poznamo specifičnih inhibitorjev za lakaze je težko oceniti posamični vpliv funkcijsko sorodnih encimov (npr. peroksidaz) na dodane substrate, saj lahko ti značilno vplivajo na končni rezultat. Poleg tega ni mogoče razlikovati med aktivnostjo glivnih in bakterijskih encimov. Torej test oksidacije ABTS, ki smo ga uporabili v tej magistrski nalogi ponazarja aktivnosti vseh fenol oksidaz in poleg teh lahko vključuje vsaj delno tudi aktivnost peroksidaz in morda še katerih drugih neznanih encimov, ki oksidirajo ABTS. V odsotnosti peroksida je ABTS specifičen substrat za lakaze (Lonergan in sod., 1997), vendar kljub večkratnim redčitvam tal med pripravo reakcijske mešanice ne moremo trditi, da je peroksid med meritvami popolnoma odsoten. Razpadni produkti ABTS lahko tudi difundirajo v okolico in delujejo kot mediatorji nadaljnje oksidacije lignina ali sorodnih molekul, kar lahko dodatno prispeva k rezultatu (Bourbonnais in Paice, 1990). Torej test aktivnosti fenol oksidaz ponuja relativno grobo oceno prisotnosti teh encimov v tleh.

5.1.1.1 Vpliv aerobne/anaerobne inkubacije na aktivnost fenol oksidaz

Lakaze kot terminalni prejemnik elektronov uporabljajo izključno kisik. Zato smo z zamenjavo sobne z dušikovo atmosfero želeli preveriti vpliv kisika na aktivnost fenol oksidaz v tleh po več dnevni inkubaciji. Ker so bili med pripravo vzorcev za merjenje aktivnosti fenol oksidaz vsi vzorci izpostavljeni sobni atmosferi, lahko v tem poglavju komentiramo rezultate samo v kontekstu povišanja ali zmanjšanja produkcije fenol oksidaz in ne tudi njihove aktivnosti pri različnih pogojih inkubacije, saj predpostavljamo, da smo med pripravo vzorca aktivirali od kisika odvisne encime tudi v primeru anaerobno inkubiranih mikrokozmov.

Pokazali smo, da pri vzorcu B aerobni mikrokozmi začno kazati povišano aktivnost fenol oksidaz po tednu inkubacije, v vzorcu C pa po 14-ih dneh ($p < 0,01$). To je skladno z odvisnostjo fenol oksidaz od prisotnosti kisika. Za boljše razumevanje rezultata bi bilo nujno spremljati koncentracijo vodikovega peroksida v reakcijski mešanici ter s tem posredno oceniti dinamiko aktivnosti peroksidaz, česar mi nismo storili in bi bil smiseln korak v primeru ponovitve poskusa. Razumemo namreč odvisnost aktivnosti lakaz od prisotnega kisika, ne pa tudi koncentracije vodikovega peroksida. V dosedanjih študijah so pokazali, da lahko anoksični pogoji inhibirajo sintezo vodikovega peroksida (Bernard in Stinson, 1999), kot tudi stimulirajo v primeru rastlinskih celic (Blokhina in sod., 2001). Praviloma velja, da se več vodikovega peroksida sintetizira ter sprošča izven celice v prisotnosti kisika (Pesakhov in sod., 2007; Seki in sod., 2004), vendar lahko dokazano nekatere bakterije, kot je *Enterococcus faecium*, obdržijo patogenost preko produkcije vodikovega peroksida tudi pri anaerobnih pogojih (Moy in sod., 2004). Poleg tega so v anaerobnih mikrokozmi lahko bile še vedno prisotne nizke koncentracije kisika. Trend povišane aktivnosti fenol oksidaz je opazen le pri pH 4,0, medtem ko pri ostalih pH ter

vzorcu A nismo dokazali, da se v oksičnih mikrokozmi poveča produkcija aktivnih fenol oksidaz v primerjavi z mikrokozmi izpostavljenih anoksičnim pogojem do mere, ko bi to lahko zaznali z našo metodo.

5.1.1.2 Izbira lignina

Eden glavnih ciljev našega raziskovalnega dela je bil preučiti vpliv bogatitve tal z ligninom na aktivnost fenol oksidaz med inkubacijo talnih mikrokozmov. Dodatek 1 % masnega deleža alkali lignina (Sigma-Aldrich) v tla je sprožil buren porast aktivnosti fenol oksidaz na dan priprave mikrokozmov ($p < 0,01$), kar bi lahko bila posledica prisotnosti lahko razgradljivih spojin v založnem alkali ligninu. To domnevo je potrdila analiza s FTIR spektroskopijo (Maja Vaukner, Oddelek za lesarstvo, osebna komunikacija). Alkali lignin (Sigma-Aldrich) namreč poleg pričakovanih polimernih struktur vsebuje tudi znatni delež monomerov in dimerov in zato ni najboljši model polimeriziranega lignina, ki so mu mikrobi izpostavljeni v naravi. Ti kratkoveržni polifenoli so po našem mnenju odgovorni za porast aktivnosti fenol oksidaz v prvi časovni točki merjenja, kjer je ta trend opazen pri vseh z izjemo dveh tretmajev. Z dano metodo je težko oceniti, v kolikšni meri ti lahko razgradljivi elementi vplivajo tudi na meritve v nadaljnjih časovnih točkah.

Da bi se izognili prisotnosti lahko razgradljivih snovi v dodanem ligninu, smo v drugem eksperimentu za bogatitev tal uporabili lignin v obliki drobno mlete lesovine, ki je bila razgrajena z glivami rjave trohnobe (darilo prof. dr. Franca Pohlevena, Oddelek za lesarstvo- BF). V nasprotju z glivami bele trohnobe, ki mineralizirajo lignin, glive rjave trohnobe razgrajujejo izključno celulozo in hemicelulozo, medtem ko se ligninsko ogrodje praviloma ohrani (Eriksson in sod., 1990). 1 % masni delež dodanega lignina v vzorce tal smo izračunali na podlagi izsledkov študije Li in sod. (2011), kjer so po 15 dneh razgradnje lesa z glivami rjave trohnobe izmerili približno 70 % vsebnost lignina. Med vzorci z / brez dodanega lignina tu nismo opazili signifikantnih razlik v aktivnosti fenol oksidaz. Ta se v začetnih časovnih točkah po dodatku mlete lesovine ni povečala. To je v nasprotju z povečano aktivnostjo fenol oksidaz, ki smo jo izmerili po dodatku alkali lignin. Sklepamo, da v razgrajenem lesu z glivami rjave trohnobe ni prisotne večje količine preprostih fenolnih spojin, kar pa ne velja za alkali lignin. Za dobljene rezultate se ponuja več možnih razlag: (1) zaradi prenizke občutljivosti uporabljene metode in relativno velike standardne napake morda trend ni jasen; (2) lahko je bil začrtan čas inkubacije prekratek in združba še ni aktivno začela razgrajevati lignina (čeprav smo na podlagi izsledkov DeAngelis in sod. (2011) domnevali, da bo aktivnost dosegla maksimum v prvih 28 dneh poskusa), (3) sama inkubacija tal v mikrokozmi lahko spremeni pogoje rasti mikroorganizmov do te mere, da dodatek lignina ni več poglobitveni vzrok sprememb v aktivnosti združbe ter (4) dodatek kompleksnega polimernega lignin v tla v kratkem obdobju inkubacije 11 dni ne vpliva na aktivnost/sintezo fenol oksidaz.

5.1.1.3 Vpliv pH na aktivnost fenol oksidaz

Aktivnost fenol oksidaz smo v okviru prvega poskusa merili pri treh različnih pH (4,0 , 5,8 in 7,6 in ugotovili, da ta pomembno vpliva na meritve. Na primer kljub kislosti vzorčenih tal (pH 4 ± 1) smo izmerili visoko aktivnost bakterijskih lakaz tudi pri višjih pH (Held in sod., 2005; Rosconi in sod., 2005). V okviru drugega eksperimenta smo meritve aktivnosti fenol oksidaz na podlagi izkušenj iz prvega poskusa izvajali zgolj pri pH 4,0. Ta se najbolje ujema s pogoji, kjer smo vzorce odvzeli (kisla tla); z dodatnimi testi smo potrdili, da so tu napake meritev najmanjše.

5.1.1.4 Vpliv ferulične kisline na aktivnost fenol oksidaz

Ferulična kislina je prekurzor pri biosintezi lignina in derivatov cinamata. V naši študiji predstavlja model monomera lignina, dodali pa smo jo v koncentraciji 100 μmol na gram suhih tal. Namen je bil ločiti učinek preprostih fenolnih spojin in zamrežene ligninske strukture na aktivnost fenol oksidaz in na sestavo mikrobne združbe. Ferulična kislina bi naj potencialno inducirala sintezo in povečala aktivnost lakaz pri glivah bele trohnobe (Farnet in sod., 2004; Revankar in Lele, 2006). V nasprotju s pričakovanji smo v barjanskih tleh izmerili nižjo aktivnost fenol oksidaz v vzorcih z dodano ferulično kislino v primerjavi s tistimi brez. Za opažen trend se ponuja več možnih razlag: (1) Pri reakciji fenol oksidaz s substratom nastane radikal, ki nadalje reagira z molekulami v neposredni bližini (Claus, 2003). Možna razlaga je torej, da ti radikali reagirajo s substratom ABTS in njegovimi razpadnimi produkti, ter s tem motijo naše meritve. (2) Ferulično kislino smo dodali v tolikšnem prebitku, da mogoče tekmuje za aktivna mesta na fenol oksidaznih encimih, pri čemer bi posledično dobili lažno nizke meritve. (3) Nazadnje, ferulična kislina lahko deluje kot kelator in reducent bakrovih ionov (Nirmal in Benjakul, 2011). Ker imajo lakaze v reaktivnem centru vezan baker, lahko visoka koncentracija ferulične kisline povzroči pomanjkanje dostopnega bakra ter s tem znižanje encimske aktivnosti lakaz. Vendar nekatere študije (Farnet in sod., 2004; Revankar in Lele, 2006) dokazujejo stimulatorni vpliv dodatka ferulične kisline na produkcijo in aktivnost lakaz v glivah bele trohnobe, kar pomeni, da bi za dokončne sklepe morali izvesti dodatne eksperimente.

5.1.2 Hitrost respiracije

S spremljanjem deleža CO_2 v plinski fazi mikrokozmov smo želeli poiskati povezave med aktivnostjo fenol oksidaz in mikrobno respiracijo; torej med specifično aktivnostjo, ki bi jo lahko spodbudil dodatek lignina in/ali ferulične kisline ter med splošno aktivnostjo mikrobne združbe v mikrokozmu. Poleg tega nam kinetika respiracije poda oceno aktivnosti združbe, na katero lahko inkubacija zaradi spremenljivih pogojev deluje destruktivno, kar bi bilo pomembno za razlago rezultatov naše študije. Meritve smo izvajali na plinskem kromatografu in sicer v šestih 24-urnih serijah meritev v časovnem obdobju 11 dni. Merjenje mikrobne respiracije je potekalo samo v okviru drugega

eksperimenta, kjer smo preverjali vpliv dodatka ferulične kisline in lignina v obliki lesovine, razgrajene z glivami rjave trohnobe.

Med inkubacijo smo pri vzorcih brez dodane ferulične kisline izmerili v vseh časovnih točkah podobno hitrost respiracije (približno $5 \mu\text{L CO}_2/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{suhih tal}}$). Izjema sta prvi časovni točki, kjer smo v vzorcu z dodanim ligninom izmerili višjo hitrost respiracije v primerjavi s kontrolo ($p < 0,01$), kar je lahko posledica razgradnje lahko dostopnih substratov ali spremembe strukture tal zaradi dodatka lignina.

Pri vzorcih z dodano ferulično kislino smo izmerili dramatičen porast respiracije po prvem dnevu inkubacije. Ker je ferulična kislina lahko razgradljiv substrat, smo to pričakovali. Od meritve po sedmih dneh inkubacije pa do končne časovne točke na enajsti dan je bila respiracija v mikrokozmi z dodano ferulično kislino konstantno višja od mikrokozmov brez ferulične kisline ($p < 0,01$), v povprečju za $4 \mu\text{L CO}_2/\text{h} \cdot \text{g}_{\text{suhih tal}}$. Dinamika respiracije v vzorcih, ki poleg ferulične kisline vsebujejo še lignin je podobna tistim, ki imajo dodano le ferulično kislino. To pomeni, da ferulična kislina prispeva večinski delež k respiraciji. Ker si ti rezultati ravno nasprotujejo z rezultati aktivnosti fenol oksidaz, kjer so vzorci z dodano ferulično kislino vztrajno kazali nižje vrednosti v primerjavi s tistimi brez, to dodatno potrjuje domneve, da ferulična kislina negativno vpliva na meritve aktivnosti fenol oksidaz in ne na metabolno aktivnost mikrobne združbe.

5.1.3 Gelska elektroforeza z gradientom denaturanta

5.1.3.1 Analiza genov za proteobakterijske lakaze

Predpostavili smo, da bo dodatek lignina oziroma ferulične kisline vplival na strukturo združbe, kar bo mogoče opaziti v spremembi DGGE profila genov za lakaze proteobakterij. Če se bo na profilu vzorcev z dodanim ligninom ojačila ali na novo pojavila lisa, ki bo odsotna na profilu vzorcev kontrole in vzorcev z dodano ferulično kislino, bi to smatrali kot relativno povečanje tistih predstavnikov v združbi, ki nosijo zapis za domnevne lakazne gene. Ti mikroorganizmi bi potencialno lahko bili udeleženi pri razgradnji polimerizirane strukture lignina. Če bi bila ta prisotna tudi pri profilu vzorca z dodano ferulično kislino, bi sklepali, da najverjetneje slednja spodbudi rast teh mikroorganizmov. Tretma, v katerem smo vzorcu tal dodali tako ferulično kislino kot lignin je pomemben saj v uvid vzame dejstvo, da pri reakciji oksidacije ferulične kisline lahko ta kot difuzibilni radikal nadalje oksidira ligninsko strukturo (Claus, 2003). Če bi potemtakem prišlo do razbitja polimerizirane oblike lignina, bi nadaljnja razgradnja potekla veliko lažje, kar bi glede na našo predpostavko, da bakterijske lakaze sodelujejo pri razgradnji lignina, zaznali tako v povišani aktivnosti fenol oksidaz, kot tudi v spremembi na DGGE profilu.

Kvaliteta rezultatov ter posledično ponovljivost metode DGGE, ki smo jo dosegli v okviru te magistrske naloge, je bila slaba kljub vztrajni optimizaciji. Po primerjavi naših rezultatov s tistimi, pridobljenimi na drugih vzorcih tal (ni prikazano) predpostavljamo, da so za slabo ponovljivost in nizko kvaliteto najverjetneje odgovorni inhibitorji PCR v kislilih šotnih tleh. Tu je potrebno izpostaviti huminske kisline, ki jih je v uporabljenih tleh obilo in so znani inhibitorji PCR reakcije (Matheson in sod., 2010). Zaradi pomanjkanja kvalitetnih slik, primerjave med tretmaji v določeni časovni točki nimamo. Na sliki 16 pa smo pokazali, da primerjava programske združenih profilov iz različnih gelov ni primerna, saj se ti razlikujejo že na dan priprave mikrokozmov, ko med združbami različnih tretmajev še ne pričakujemo razlik. Deloma so uporabne le slike, ki prikazujejo spreminjanje profila genov za lakaze po času, ločeno za vsak tretma.

Med primerjavo dobljenih DGGE profilov smo uporabili Pearsonov koeficient za izračun distančne matrike ter UPGMA algoritem za izris fenetskih dreves. Na vseh drevesih z izjemo tretmaja z dodano ferulično kislino se dosledno ločujejo zgodnje in poznejše časovne točke inkubacije, vendar ločnica ni vedno pri istem času. Ta je med 2. in 7. dnem pri kontrolah ter med 7. in 14. dnem v primeru tretmaja z dodanim ligninom in ferulično kislino, kar se ujema s študijo DeAngelis in sod., (2011). V primeru tretmaja z dodanim ligninom lahko vidimo tri skupke, ki praviloma ločijo prvo in zadnjo časovno točko, tretja skupina pa zajema vse vmesne. Ostala razvejišča imajo relativno nizke bootstrap vrednosti in so občutljiva na izbiro distančne matrike ter vrste fenetskega drevesa, zato smatramo, da rezultati niso dovolj zanesljivi za globljo interpretacijo. Namenoma je iz diskusije zaradi slabe kvalitete gela izpuščen tretma z dodano ferulično kislino. Iz rezultatov sklepamo, da se združba skozi potek inkubacije spreminja, vendar med tretmaji zelo različno.. Za konkretnije zaključke bi bilo potrebno analizirati več paralelnih primerljivih gelov ali pa uporabiti alternativno metodo za analizo, ki vključuje pripravo knjižnic genov ter njihovo sekvenciranje.

5.1.4 Analiza genov za 16S rRNA

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabljali za pomnoževanje genov za lakaze, so omejeni na deblo *Proteobacteria*. Da bi razširili spekter opazovanih bakterij v združbi in našli možno povezavo med spremembami v profilu genov za lakaze ter spremembami v celotni bakterijski združbi, smo postopek DGGE profiliranja ponovili še z geni za 16S rRNA. Opazili smo, da se v tretmajih z dodano ferulično kislino v časovnih točkah po 7 in 14 dneh inkubacije DGGE profil znatno spremeni. Lise, ki so se v primerjavi z zgodnjimi časovnimi točkami inkubacije močno ojačile ali na novo pojavile, smo iz gela izrezali ter sekvencirali z metodo po Sangerju. Zaporedje z največjo podobnostjo je bilo za posamezno sekvenco s seznama ponujenih v BLASTx (NCBI, 2013) izbrano na podlagi E vrednosti. Izpuščeni so bili vsi zadetki, ki so vključevali zaporedja pridobljena direktno iz tal in niso vezana na seve, ki jih znamo gojiti v laboratoriju.

Vse sekvence z izjemo enega primera, kjer sekvenciranje ni bilo uspešno, so pripadala rodu *Burkholderia*. Ker so se analizirane lise pojavile dosledno in samo v profilih tretmajev z dodano ferulično kislino, je velika verjetnost, da je ravno slednja spodbudila rast najdenih burkholderij. V trenutno dostopni literaturi je število objav, ki opisujejo metabolizem ferulične kisline ali njenih intermediatov razgradnje pri Burkholderijah, omejeno. V študiji Rashamuse in sod., (2007) so opisali etil ferulat esterazo (estEFH5) iz *B. multivorans* UWC10, ki izraža afiniteto do kratkoverižnih rho-nitrofenil estrov. V študiji Mitsui in sod., (2010) so pokazali, da lahko *Burkholderia cepacia* raste na ferulični kislini kot edinem viru ogljika. Iz nje so izolirali vanilin dehidrogenazo, ki izkazuje encimatsko aktivnost do nekaterih aromatskih aldehydov. Kljub temu se zavedamo, da so razlike v DGGE profilih lahko posledica različnih sprememb, ki sledijo dodatku ferulične kisline v vzorec tal.

Ta študija je bila prva, ki je z metodo inkubacije tal v mikrokozmi preverjala vpliv dodatka native oblike lignina na prisotne bakterijske lakaze. V objavljenih študijah lakazne aktivnosti v tleh raziskovalci k problemu praviloma pristopajo z izolacijo producentnega organizma ali encima iz tal ter nato dalje raziskavo izvedejo v pripravljenih gojiščih. Zaradi kompleksne heterogene sestave tal kot substrata je malo objav, ki bi proučevale dinamiko lakaz v talnih mikrokozmi. V študiji Donnely in sod., (1990) so v mikrokozmi gozdnih tal sedem tednov opazovali vpliv pH, temperature in vlage na mikrobno biomaso, razgradnjo glukoze ter lignina. Mikrokozmi so bili obogateni s C-14 izotopsko označenim fenilalaninom, ki je prednostno vstavljen v lignin in C-14 izotopsko označeno glukozo, ki prednjači v celulozi. Medtem ko pH po izsledkih študije ni imel vpliva na nobenega izmed treh parametrov, sta tako povišana temperatura kot vlažnost sprožila povečanje mikrobne biomase ter povišano razgradnjo lignina in celuloze. V študiji Zhou in Wu, (2012) so pokazali, da se ob dodatku ferulične kisline v rizosfero kumaric poviša dehidrogenazna aktivnost ter poveča mikrobna biomasa. Z DGGE so pokazali, da se v primeru dodatka ferulične kisline raznolikost bakterijske združbe zmanjša, nasprotno se na primeru glivne združbe poveča. V študiji Wu in sod., (2008) so pokazali, da lahko substratu tal dodamo prečiščene lakaze ter te pri tem ohranijo aktivnost. Lakaza DAIWA Y120 (izolirana iz *Trametes*) je reagirala s policikličnimi aromatskimi ogljikovodiki v tleh, prav tako pa so dokazali signifikantno disimilacijo benzo(a)pirena in toksičnih ekvivalentov v obdobju 14 dni, kar nakazuje na potencialno uporabnost lakaz za razstrupljanja tal. Po 14-ih dnevih inkubacije je bila aktivnost dodanih lakaz popolnoma izgubljena, medtem ko je mikrobna združba ostala skozi čas inkubacije nespremenjena, kar nakazuje, da metoda za substratna tla ni bila invazivna. Menimo, da so tovrstne študije mikrobne združbe v tleh nujen dodatek k študijam na izoliranih organizmih ali encimih, saj je razgradnja fenolnih polimerov izrazito sinergistična reakcija, v kateri verjetno sodelujejo različni mikroorganizmi in jo je zato zahtevno simulirati v *in vitro* pogojih.

5.2 SKLEPI

Na podlagi rezultatov našega raziskovalnega dela lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Alkali lignin je povišal fenol oksidazno aktivnost šotnih kislih tal v prvem dnevu inkubacije, po več dnevni inkubaciji pa je vpliv alakali lignina izzvenel in fenol oksidazna aktivnost se ni signifikantno razlikovala od netretiranih različic mikrokozmov.
- lignin pridobljen iz lesovine ni sprožil močnega povišanja fenol oksidazne aktivnosti v kislih šotnih tleh
- dodatek ferulične kisline v tla je znižal aktivnost fenol oksidaz;
- dodatek lignina v tla ni vplival na respiracijo (celokupno metabolno aktivnost mikrobne združbe), pozitiven vpliv pa smo zaznali po dodatku ferulične kisline;
- v šotnih kislih tleh se sestava genov za proteobakterijske lakaze spreminja med inkubacijo, vendar rezultati DGGE analiz niso bili dovolj ponovljivi, da bi lahko natančneje opredelili vpliv dodatka lignina in/ali ferulične kisline;
- analiza genov za 16S rRNA z metodo DGGE in sekvenciranjem je pokazala, da se po tednu inkubacije v prisotnosti ferulične kisline signifikantno namnožijo predstavniki ruda *Burkholderia*.
- v tleh izpostavljenih anoksičnim pogojem je fenol oksidazna aktivnost po 7 do 14-ih dneh inkubacije nižja v primerjavi z aktivnostjo v oksičnih tleh. Ta trend smo opazili v dveh od treh vzorcev tal.

6 POVZETEK

Razgradnja lignina je tako z energetskega, kot tudi časovnega vidika zahteven korak v mnogih industrijskih postopkih, ki uporabljajo les kot izhodni material. Kljub temu, da v standardnih postopkih razbitja lignoceluloze še vedno prevladujeta kemijski in mehanski način, se encimska razgradnja ponuja kot obetavna alternativa. Pri tem lakaze v sodelovanju s peroksidazami ključno vplivajo na encimsko razgradnjo lignina, vendar mehanizem zaradi kompleksnosti substrata še ni popolnoma razumljen. Medtem ko so pri glivah lakaze že razmeroma dobro preučene, je raziskovanje bakterijskih lakaz trenutno še v polnem zamahu. Namen pospešenega raziskovanja slednjih je predvsem v možnosti biotehnološke manipulacije encimov s stremljenjem k širšim fizikalnim in kemijskim spektrom delovanja, kar je v primeru glivnih encimov omejeno, zanimive pa so tudi zato, ker biološka vloga teh encimov pri bakterijah, kljub njihovi pestrosti, še ni dobro razumljena.

Šotna tla so zaradi visoke vsebnosti slabo razgrajenega organskega materiala obetaven ekosistem za iskanje novih bakterijskih lakaz. Slednje pa imajo širok nabor potencialnih substratov, in ker nas zanima razgradnja polimerizirane oblike lignina, smo s kombinacijo tretmajev, v katere smo dodali lignin ali/in ferulično kislino, želeli spodbuditi namnožitev potencialnih bakterijskih producentov lakaz. Na podlagi pridobljenih rezultatov sklepamo, da je lesovina, tretirana z glivami rjave trohnobe primernejši model lignina kot lignin Sigma-Aldrich, saj slednji vsebuje nepolimerizirane ostanke, ki motijo tovrstne študije. Nadalje menimo, da ima test razgradnje ABTS preveliko eksperimentalno napako ter premajhno občutljivost, in zato ni primeren za sledenje spremembi aktivnosti fenol oksidaz v vzorcih tal po protokolu, uporabljenem v tej študiji. Z DGGE profiliranjem iz tal pomnoženih genov za proteobakterijske lakaze ter 16S rRNA smo želeli preveriti vpliv dodanih substratov v časovnem obdobju 28 dni na prisotno bakterijsko združbo. Pokazali smo, da se profili tako na nivoju genov za lakaze kot tudi za 16S rRNA po času spreminjajo, ne moremo pa postaviti trdnih zaključkov o vplivu lignina oz ferulične kisline na proteobakterijske lakaze. Bolj jasno razliko smo opazili na nivoju genov za 16S rRNA, kjer je prišlo v mikrokozmi tretiranih s ferulično kislino ali ferulično kislino in ligninom do očitnih sprememb v sestavi združbe in do obogatitve s predstavniki rodu *Burkholderia*. Sklepamo, da so za nezadostno ponovljivost in nizko kvaliteto rezultatov odgovorni inhibitorji v tleh z visoko vsebnostjo organske snovi. Ta po našem mnenju vpliva na vse stopnje poskusa, od izolacije skupne DNA iz tal, pa do pomnoževanja ter DGGE profiliranja genskih pomnožkov.

Zaključimo lahko, da je pristop z mikrokozmi pomemben za celovito razumevanje razgradnje lignina, saj je kompleksnost tega procesa nemogoče poustvariti v umetnih pogojih. Vendar je za učinkovitejše raziskovanje potrebno optimizirati obstoječe ali uvesti nove metode za opazovanje aktivnosti fenol oksidaz ter razviti učinkovitejše molekularne metode za sledenje spremembam mikrobne strukture na nivoju lakaznih genov.

7 VIRI

- Achterholt S., Priefert H., Steinbuchel A. 2000. Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR 167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 799-807
- Agematu H., Kominato K., Shibamoto N., Yoshioka T., Nishida H., Okamoto R., Shin T., Murao S. 1993. Transformation of 7-(4-hydroxyphenylacetamido) cephalosporanic acid into a new cephalosporin antibiotic, 7-(1-oxaspiro(2.5) octa-6-oxo-4,7-diene-2-carboxamido) cephalosporanic acid, by laccase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57: 1387-1388
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410
- Arica M. Y., Altintas B., Bayramoglu G. 2009. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. *Bioresource Technology*, 100, 2: 665-669
- ARSO. 2013. Meterološki letopis 2009 – mesečna količina padavin. Ljubljana, ARSO - Agencija republike Slovenije za okolje: 4 str.
<http://www.arso.gov.si/>
- Ausec L., Dirk van Elsas J., Mandic-Mulec I. 2011. Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 5: 975-983
- Ausec L., Kraigher B., Mandič-Mulec I. 2009. Differences in the activity and bacterial community structure of drained grassland and forest peat soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 41: 1874-1881
- Bailey M.R., Woodard S.L., Callawy E., Beifuss K., Magallanes-Lundback M., Lane J. 2004. Improved recovery of active recombinant laccase from maize seed. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 390-397
- Baldrian P. 2004. Purification and characterization of laccase from white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 560-563
- Baldrian P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 215-242
- Barbosa A.M., Dekker R.F.H., St. Hardy G.E. 1996. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 2: 93-96

- Barnard J. P., Stinson M. W. 1999. Influence of environmental conditions on hydrogen peroxide formation by *Streptococcus gordonii*. *Infection and Immunity*, 67, 12: 6558-6564
- Baumann K., Dignac M. F., Rumpel C., Bardoux G., Sarr A., Steffens M., Maron P. A. 2013. Soil microbial diversity affects soil organic matter decomposition in a silty grassland soil. *Biogeochemistry*, 114,1-3: 201-212
- Bento I., Arménia Carrondo M., Lindley P.F. 2006. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases: Structural and modelling studies focusing on proton transfer. *BMC Structural Biology*, 10:28, doi:10.1186/1472-6807-10-28: 14 str.
- Blanch H.W., Adams P.D., Andrews-Cramer K.M., Frommer W.B., Simmons B.A. 2008. Addressing the need for alternative transportation fuels: The Joint BioEnergy Institute. *ACS Chemical Biology*, 3: 17–20
- Blokhina O. B., Chirkova T. V., Fagerstedt K. V. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 52, 359: 1179-1190
- Blum U. 1998. Effects of microbial utilization of phenolic acids and their phenolic acid breakdown products on allelopathic interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 4: 685-708
- Bourbonnais R., Paice M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*, 267: 99-102
- Bugg T. D., Ahmad M., Hardiman E. M., Singh R. 2011. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 3: 394-400
- Bumpus J. A., Steven D. A. 1987. Biodegradation of environmental pollutants by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system. *BioEssays*, 6, 4: 166-170
- Buswell J. A., Cai Y. J., Chang S. T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 81-88
- Call H.P., Mucke I. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym-process). *Journal of Biotechnology*, 53: 163-202
- Charles D. 2009. Corn-based ethanol flunks key test. *Science*, 324: 587–587

- Claus H. 2003. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35: 93-96
- Claus H., Filip Z. 1997. The evidence of a laccase-like activity in a *Bacillus sphaericus* strain. *Microbiological Research*, 152: 209-215
- Cordi L., Minussi R. C., Freire R. S., Durán N. 2007. Fungal laccase: copper induction, semi-purification, immobilization, phenolic effluent treatment and electrochemical measurement. *African Journal of Biotechnology*, 6, 10:1255-1259
- Crestini C., Crucianelli M., Orlandi M., Saladino R. 2010. Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers. *Catalysis Today*, 156, 1-2: 8-22
- De Jong E., de Vries F. P., Field J. A., van der Zwan R. P., de Bont J. A. M. 1992. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycological Research*, 96: 1098-1104
- De Jong E., Field J. A., de Bont J. A. M. 1997. Stimulation of aryl metabolite production in the basidiomycete *Bjerkandera* sp. strain BOS55 with biosynthetic precursors and lignin degradation products. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 5: 1987-1994
- DeAngelis K. M., Allgaier M., Chavarria Y., Fortney J. L., Hugenholtz P., Simmons B., Sublette K., Silver W. L., Hazen T. 2011. Characterization of trapped lignin-degrading microbes in tropical forest soil. *PLoS ONE*, 6, 4: e19306, doi:10.1371/journal.pone.0019306 : 9 str.
- DeRito C.M., Pumphrey G.M., Madsen E.L. 2005. Use of field-based stable isotope probing to identify adapted populations and track carbon flow through a phenoldegrading soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 7858–7865
- Dien B.S., Jung H.J.G., Vogel K.P., Casler M.D., Lamb J.F.S. 2006. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass & Bioenergy*, 30: 880–891
- Donnelly P. K., Entry J. A., Crawford D. L., Cromack K. 1990. Cellulose and lignin degradation in forest soils - response to moisture, temperature, and acidity. *Microbial Ecology*, 20, 3: 289-295
- Dwivedi U. N., Priyanka S., Pandey V. P., Kumar A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*, 68: 117-128

- Endo K., Hosono K., Beppu T., Ueda K. 2002. A novel extracytoplasmatic phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. *Microbiology*, 148: 1767-1776
- Eriksson K. E. L., Blanchette R. A., Ander P. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Berlin, Springer: 1–72
- Faix O. 1991. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforschung*, 45, Suppl. 1: 21-27
- Farnet A. M., Criquet S., Cigna M., Gil G., Ferré E. 2004. Purification of a laccase from *Marasmius quercophilus* induced with ferulic acid: reactivity towards natural and xenobiotic aromatic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 6: 549-554
- Fernandes A. T., Damas J. M., Todorovic S., Huber R., Bratto M. C. 2010. The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity. *FEBS Journal*, 277, 15: 3176-3189
- Floch C., Alarcon-Gutierrez E., Criquet S. 2007. ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 71, 3: 319-324
- Freeman J.C., Nayar P.G., Begley T.P., Villafranca J.J. 1993. Stoichiometry and spectroscopic identity of copper centers in phenoxazinone synthase: a new addition to the blue copper oxidase family. *Biochemistry*, 32, 18: 4826-4830
- Gamelas J. A. F., Tavares A. P. M., Evtuguin D. V., Xavier A. M. B. 2005. Oxygen bleaching of kraft pulp with polyoxometalates and laccase applying a novel multi-stage process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33: 57-64
- Gardiol A. E., Hernandez R. J., Reinhammar B., Hate B. R. 1996. Development of gasphase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 18: 347-352
- Gasson M. J., Kitamura Y., McLauchlan W. R., Narbad A., Parr A. J., Parsons E. L. H., Payne J., Rhodes M. J. C., Walton N. J. 1998. Metabolism of ferulic acid to vanillin: A bacterial gene of the enoyl-SCoA hydratase/isomerase superfamily encodes an enzyme for the hydration and cleavage of a hydroxycinnamic acid SCoA thioester. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 4163-4170
- Ghindilis A. L., Makower A., Bauer C.G., Bier F.F., Scheller F.W. 1995. Determination of p-aminophenol and catecholamines at picomolar concentrations based on recycling enzyme amplification. *Analytica Chimica Acta*, 304: 25-31

- Gianfreda L., Xu F., Bollag J. M. 1999. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 3: 1-25
- Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M.L., Bally R. 1993. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere : evidence for laccase activity in nonmotile strains of *Azospirillum lipoferum*. *FEMS Microbiology Letters*, 108: 205-210
- Grotewold E., Taccioli G. E., Aisemberg G. O., Judewicz N. D. 1998. Purification of an extracellular fungal laccase. *Mircen Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 4: 357-363
- Gu W., Yang J., Lou Z., Liang L., Sun Y. 2011. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter* sp. Px6-4. *PLoS ONE*, 6, 1: e16262, doi:10.1371/journal.pone.0016262: 9. str.
- Gutiérrez A., del Río J. C., Ibarra D., Rencoret J., Romero J., Speranza M., Camarero S., Martínez M. J., Martínez A. T. 2006. Enzymatic removal of free and conjugated sterols forming pitch deposits in environmentally sound bleaching of eucalypt paper pulp. *Environmental Science & Technology*, 40: 3416-3422
- Hacin J., Čop J., Mahne I. 2001. Nitrogen mineralization in marsh meadows in relation to organic matter content and watertable level. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164: 503-509
- Hacin J., Čop J., Železnik B., Jamnik B. 2004. Opredelitev vodnega režima v bodočem krajinskem parku Ljubljansko barje. Raziskovalni projekt. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 20 str.
- Hammel K. E., Cullen D. 2008. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 349-355
- Held C., Kandelbauer A., Schröder M., Cavaco-Paulo A., Gübitz G. M. 2005. Biotransformation of phenolics with laccase containing bacterial spores. *Environmental Chemistry Letters*, 3, 2: 74-77
- Hernández-Romero D., Solano F., Sanchez-Amat A. 2005. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 6808-6815
- Hess J., Leitner C., Galhaup C. 2002. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology-Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 98, 100: 229-241

- Hoegger P.J., Kilaru S., James T.Y., Thacker J.R., Kües U. 2006. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS Journal*, 273: 2308-2326
- Hoopes J.T., Dean J.F.D. 2004. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 27-33
- Hu X. K., Zhao X. H., Hwang H. M. 2007. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere*, 66, 9: 1618-1626
- Hullo M. F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. *Journal of Bacteriology*, 183, 18: 5426-5430
- Ibrahim N. A., Gouda M., El-Shafei A. M., Abdel-Fatah O. M. 2007. Antimicrobial activity of cotton fabrics containing immobilized enzymes. *Journal of Applied Polymer Science*, 104, 3: 1754-1761
- Jeon J. R., Baldrian P., Murugesan K., Chang Y.S. 2011. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microbial Biotechnology*, 5, 3: 318-332
- Johannes C., Majcherczyk A. 2010. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78, 2: 193-199
- Kawai S., Umezawa T., Shimada M., Higushi T. 1988. Aromatic ring cleavage of 4,6-di(*tert*-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. *FEBS Letters*, 236, 2: 309-311
- Kellner H., Luis P., Zimdars B., Kiesel B., Buscot F. 2008. Diversity of bacterial laccase-like multicopper oxidase genes in forest and grassland Cambisol soil samples. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 3: 638-648
- Kiiskinen L. L., Kruus K., Bailey M., Ylösmäki E., Siika-aho M., Saloheimo M. 2004. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme. *Microbiology*, 150, 9:3065-3074
- Ko E. M., Leem Y. E., Choi H. T. 2001. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 98-102
- Koga S., Ogawa J., Choi Y., Shimizu S. 1999. Novel bacterial peroxidase without catalase activity from *Flavobacterium meningosepticum*: purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1435: 117-126

- Kraigher B., Stres B., Hacin J., Ausec L., Mahne I., Van Elsas J. D., Mandić-Mulec I. 2006. Microbial activity and community structure in two drained soils in the Ljubljana Marsh. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 2762-2771
- Kumar S. V. S., Phale P. S., Durani S., Wangikar P. P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*, 83: 386–394
- Landete J. M., Rodriguez H., Curiel J. A., de las Rivas B., Mancheno J. M., Munooz R. 2010. Gene cloning, expression, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Lactobacillus brevis* RM84. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 6: 617-624
- Lang M., Kanost M. R., Gorman M. J. 2012. Multicopper oxidase-3 is a laccase associated with the peritrophic matrix of *Anopheles gambiae*. *PLOS ONE*, 7, 3: e33985, doi: 10.1371/journal.pone.0033985: 8 str.
- Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., Brakhage A. A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 38, 2: 143-158
- Lee J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, 56, 1: 1-24
- Li G. Y., Huang L. H., Hse C. Y., Qin T. F. 2011. Chemical compositions, infrared spectroscopy, and X-ray diffractometry study on brown-rotted woods. *Carbohydrate Polymers*, 85, 3: 560-564
- Llaod S., Covino S., Solanas A. M., Vinas M., Petruccioli M., D'annibale A. 2013. Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *Journal of Hazardous Materials*, 248-249:407-414
- Lonergan G., Mew E., Schliephake K., Baker W. L. 1997. Phenolic substrates for fluorometric detection of laccase activity. *FEMS Microbiological Letters*, 153, 2: 485-490
- Lopez-Serrano D., Solano F., Sanchez-Amat A. 2007. Involvement of a novel copper chaperone in tyrosinase activity and melanin synthesis in *Marinomonas mediterranea*. *Microbiology-SGM*, 153: 2241-2249
- Lu G. H., Chan K., Leung K., Chan C. L., Zhao Z. Z., Jiang Z. H. 2005. Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis*. *Journal of Chromatography A*, 1068, 2: 209-219

- Machczynski M. C., Vijgenboom E., Samyn B., Canters G. W. 2004. Characterization of SLAC: A small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 13: 2388-2397
- Martinez A. T., Speranza M., Ruiz-Duenas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillen F., Martinez M. J., Gutierrez A., del Rio J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204
- Masai E., Harada K., Peng X., Kitayama H., Katayama Y., Fukada M. 2002. Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 9: 4416-4424
- Masai E., Katayama Y., Fukada M. 2007. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71, 1: 1-15
- Matheson C. D., Gurney C., Esau N., Lehto R. 2010. Assessing PCR Inhibition from Humic Substances. *Open Enzyme Inhibition Journal*, 3: 38-45
- McCaig B. C., Meagher R. B., Dean J. F. 2005. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 221: 619-636
- Michener C. D., Sokal R.R. 1957. A quantitative approach to a problem of classification. *Evolution*, 11: 490-499
- Mikolasch A., Niedermeyer T.H.J., Lalk M., Witt S., Seefeldt, S., Hammer E., Schauer F., Salzar M., Hessel S., Jülich W.D., Lindequist U. 2007. Novel cephalosporins synthesized by amination of 2,5-dihydroxybenzoic acid derivatives using fungal laccases II. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 3: 412-416
- Mikolasch A., Schauer F. 2009. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 605-624
- Mitsui R., Hirota M., Tsuno T., Tanaka M. 2010. Purification and characterization of vanillin dehydrogenases from alkaliphile *Micrococcus* sp TA1 and neutrophile *Burkholderia cepacia* TM1. *FEMS Microbiological Letters*, 303, 1: 41-47
- Miyazaki K. 2005. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. *Extremophiles*, 9, 6: 415-425
- Molina-Guijarro J. M., Perez J., Munoz-Dorado J., Guillen F., Moya R., Hernandez M., Arias M.E. 2009. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. *International Microbiology*, 12: 13-21

- Moy T. I., Mylonakis E., Calderwood S. B., Ausubel F. M. 2004. Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*, 72, 8: 4512-4520
- Munch J. M., Totche K. U., Kaiser K. 2002. Physicochemical factor controlling the release of dissolved organic carbon from columns of forest subsoils. *European Journal Of Soil Science*, 53: 311-320
- Muyzer G., De Wall E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Nagai M., Kawata M., Watanabe H., Ogawa M., Saito K., Takesawa T., Kanda K., Sato T. 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology*, 149, 9: 2455-2462
- Narbad A., Gasson M. J. 1998. Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology-UK*, 144: 1397-1405
- NCBI. 2013. BLAST-Basic Local Alignment Search Tool. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information: software
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (januar 2013)
- Nikitina V. E., Vetchinkina E. P., Ponomareva E. G., Gogoleva V. 2010. Phenol oxidase activity in bacteria of genus *Azospirillum*. *Microbiology*, 79, 3: 327-333
- Nirmal N., Benjakul S. 2011. Inhibition kinetics of catechin and ferulic acid on polyphenoloxidase from cephalothorax of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 131: 569–573
- Peng R.H., Xiong A.S., Xue Y., Fu X.Y., Gao F. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 927–955
- Pesakhova S., Benistya R., Sikrona N., Cohenb Z., Gomelskya P., Khozin-Goldberg I., Dagana R., Porata N. 2007. Effect of hydrogen peroxide production and the Fenton reaction on membrane composition of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1768, 3: 590–597
- Petersen B. R., Mathiasen T. E., Peelen B., Andersen H. 1996. Use of laccase for deoxygenation of oil-containing product such as salad dressing. PCT international application, WO 9635768 A1: 8 str.

- Piontek K., Antorini M., Choinowsk T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 227: 37663-37669
- Priefert H., Rabenhorst J., Steinbüchel A. 1997. Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *Journal of Bacteriology*, 179, 8:2595-2607
- Prim N., Pastor F. I. J., Diaz P. 2001. Cloning and characterization of a bacterial cell-bound type B carboxylesterase from *Bacillus* sp. BP-7. *Current Microbiology*, 42: 237-240
- Ramachandra M., Crawford D. L., Hertel G. 1988. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 12: 3057-3063
- Rashamuse K. J., Burton S. G., Crowan D. A. 2007. A novel recombinant ethyl ferulate esterase from *Burkholderia multivorans*. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 5: 1610-1620
- Rekuć A., Bryjak J., Szymanska K., Jarzebski A. B. 2009. Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity. *Process Biochemistry*, 44, 2: 191-198
- Revankar M. S., Lele S. S. 2006. Enhanced production of laccase using a new isolate of white rot fungus WR-1. *Process Biochemistry*, 41, 3: 581-588
- Rosconi F., Fraguas L. F., Martinez-Drets G., Castro-Sowinski S. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 5: 800-807
- Ruijsenaars H. J., Hartmans S. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65: 177-182
- Sanchez-Amat A., Lucas-Elio P., Fernandez E., Garcia-Borron J.C., Solano F. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547: 104-116
- Seki M., Iida K., Saito M., Nakayama H., Yoshida S. 2004. Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. *Journal of Bacteriology*, 186, 7: 2046-2051

- Servili M., Destefano G., Piacquadio P., Sciancalepore V. 2000. A novel method for removing phenols from grape must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 357-361
- Sharma K. K., Kuhad R. C. 2009. An evidence of laccases in archaea. *Indian Journal of Microbiology*, 49: 142–150
- Shraddha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. 2011. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Research*, 2011: ID 217861, doi: 10.4061/2011/217861: 11 str.
- Singh S., Simmons B.A., Vogel K.P. 2009. Visualization of biomass solubilization and cellulose regeneration during ionic liquid pretreatment of switchgrass. *Biotechnology and Bioengineering*, 104: 68–75
- Solomon E. I., Baldwin M.J., Lowery M. D. 1992. Electronic structure of active sites in copper proteins: contributions to reactivity. *Chemistry Review*, 92: 521-542
- Suzuki T., Endo K., Iro M., Tsujibo H., Miyamoto K., Inamori Y. 2003. A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, chracterization, nucleotide sequence, and expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67: 2167-2175
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739
- Thurston C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140: 19-26
- Tzanov t., Basto C., Gubitz G. M., Cavaco-Paulo A. 2003. Laccases to improve the whiteness in a conventional bleaching of cotton. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288, 10: 807-810
- Venturi V., Zennaro F., Degrassi G., Okeke B. C., Bruschi C. V. 1998. Genetics of ferulic acid bioconversion to protocatechuic acid in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *Microbiology*, 144: 965-973
- Vicuna R. 1988. Bacterial degradation of lignin. *Enzyme and Microbial Technology*, 10: 646-655
- Wang C. J., Thiele S., Bollag J. 2002. Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene and 4-amino-2,6-dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42: 1-8

- Wang H. X., Ng T. B. 2004. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 2:450-454
- Wei H., Xu Q., Taylor LE, Baker J.O., Tucker M.P. 2009. Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 330–338
- Williamson G., Kroon P.A., Faulds C.B. 1998. Hairy plant polysaccharides: a close shave with microbial esterases. *Microbiology*, 144: 2011-2023
- Wong D.W. 2009. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157: 174-209
- Wu Y., Teng Y., Li Z., Liao X., Luo Y. 2008. Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 40: 789-796
- Xu F., Shin W., Brown S.H., Wahleithner J.A., Sundaram U.M., Solomon E.I. 1998. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. *Biochemistry Journal*, 334: 63-70
- Xu Q. H., Fu Y. J., Gao Y., Qin M. H. 2009. Performance and efficiency of old newspaper deinking by combining cellulase/hemicellulase with laccase-viol uric acid system. *Waste Management*, 29, 5: 1486-1490
- Zhou X. G., Wu F. Z. 2012. Effects of amendments of ferulic acid on soil microbial communities in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus L.*). *European Journal of Soil Biology*, 50: 191-197
- Zimmermann W. 1990. Degradation of lignin by bacteria. *Journal of Biotechnology*, 13: 119-130

ZAHVALA

Mentorici prof. dr. Ines Mandić-Mulec za zaupanje, vodenje ter nasvete, ki so bili dragoceni tako za uspešno zaključeno magistrsko delo kot tudi za zorenje študenta v mikrobiologa.

Recenzentki doc. dr. Marjetki Suhadolc za hiter odziv in koristne nasvete ter predsednici komisije prof. dr. Romani Marišek-Logar za profesionalno sodelovanje.

Delovnemu mentorju Luki Ausecu za vse vložene ure in znanje ter za energijo in pristop, ki sta mi v zgled in motivacijo pri nadaljnjem udejstvovanju.

Tjaši Danevčič in Vesni Jerman za pomoč pri delu ter vsem ostalim zaposlenim na katedri za koristne nasvete ter prijetno družbo, zaradi katere se vedno počutim dobrodošel.

Mami Zmagi ter očetu Karlu, ki sta mi s potrpljenjem, neomajno podporo in ljubeznijo tlakovala življenjsko pot do mesta, od koder lahko s ponosom zrem v prihodnost.

Vsem prijateljem in kolegom, ker smeh ni vreden truda, dokler se nekdo ne smeji s tabo.

PRILOGE

Priloga A: Dodatni testi aktivnosti fenol oksidaz

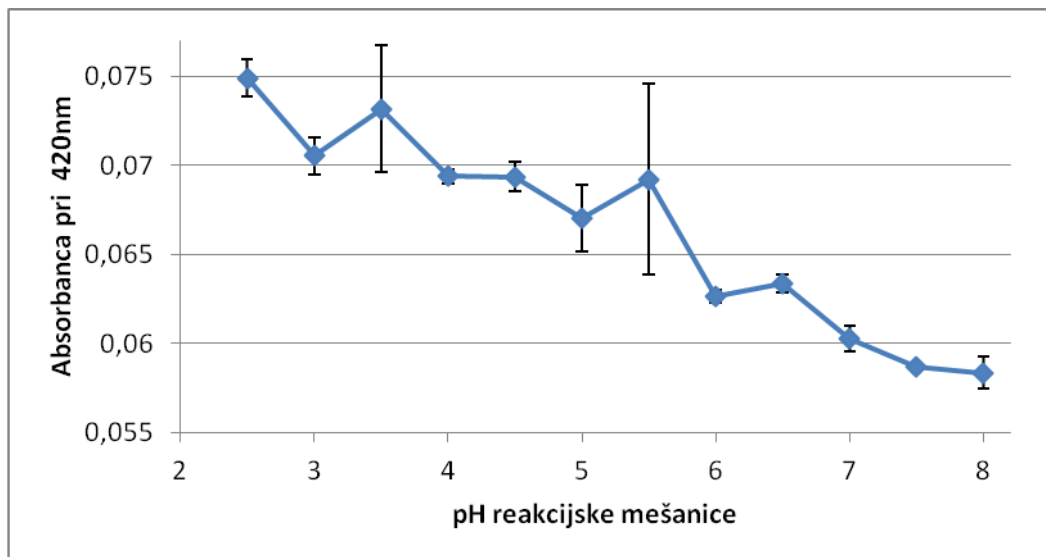
Ker smo med izvajanjem testa aktivnosti fenol oksidaz praviloma dobivali nekonsistentne rezultate z visoko eksperimentalno napako, smo opravili vrsto testov, s katerimi smo poskušali oceniti vpliv različnih fizikalno kemijskih dejavnikov na meritve aktivnosti fenol oksidaz v tleh.

Vpliv dolžine avtoklaviranja

Ugotovili smo, da dolžina avtoklaviranja tal (0,5 h, 1 h in 2 h) ne vpliva na absorbanco pri 420 nm valovne dolžine. Avtoklavirana tla smo uporabili kot negativno kontrolo vpliva mikrobne združbe na oksidacijo ABTS (rezultati niso prikazani) in se pri eksperimentalnem delu odločili za 0,5 h avtoklaviranja pri 121 °C.

Vpliv pH na abiotsko oksidacijo ABTS

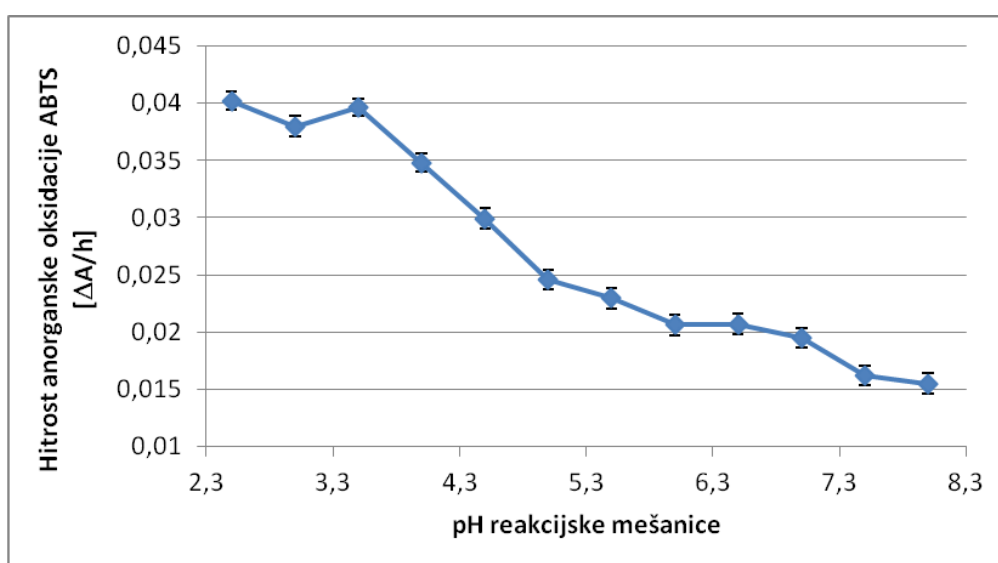
Vrednotili smo tudi vpliv pH reakcijske mešanice na spontano abiotsko oksidacijo ABTS. Eksperiment smo izvajali v 0,025 M raztopini ABTS v pufru s pH od 2,5 do 8; presledek po 0,5. Po eni uri stresa smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 420 nm in ugotovili značilen vpliv pH na absorbanco raztopine ABTS (Priloga 1). Pokazali smo, da se absorbanca s pH niža in je za pH vrednosti primerljive tistim, ki so bile uporabljene v naši raziskavi (pH 4,0, 6,0 in 7,5) signifikantno razlikuje ($p < 0,01$).



Priloga A1: Absorbanca raztopine ABTS pri 420 nm v odvisnosti od pH reakcijske mešanice. Prikazana so povprečja in standardne napake (N=3).

Višja abiotska oksidacija ABTS pri nižjih pH predlaga, da je izvajanje testa aktivnosti fenol oksidaz bolj primerno pri višjih pH. V našem primeru predpostavljamo, da večinski del spontane oksidacije ABTS iz rezultata izločimo z odštetjem avtoklavirane kontrole.

Ker test aktivnosti fenol oksidaz zahteva dolgotrajno pripravo vzorcev, ki vključuje homogeniziranje s stresanjem (1 h), polnjenje mikrotitrskih plošč in centrifugiranje, nas je zanimala kinetika anorganske oksidacije ABTS (Priloga 2A). Hitrost za posamezni pH je bila izračunana kot naklon linearne regresije 30-ih meritev absorbance pri valovni dolžini 420 nm, v časovnem intervalu ene ure. Eksperimentalna napaka je predstavljena kot standardna napaka pri izračunu naklona linearne regresije.

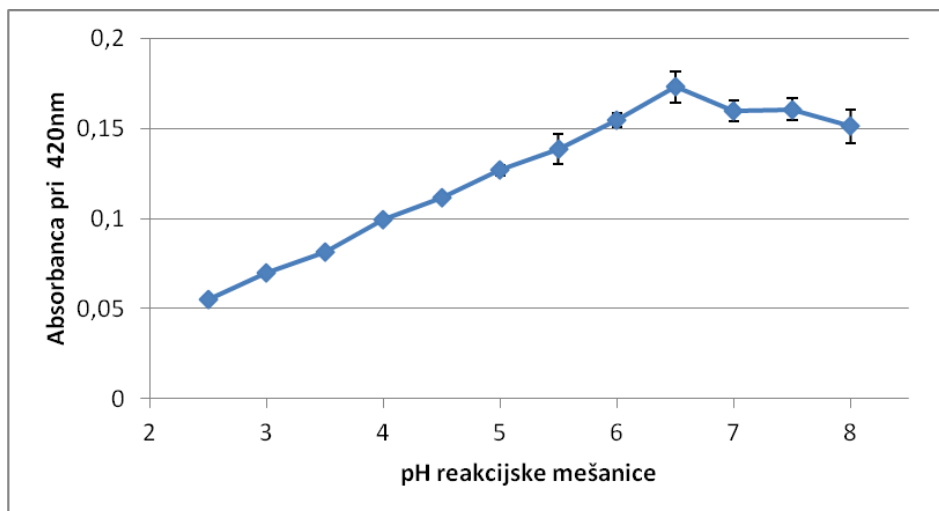


Priloga A2: Hitrost anorganske oksidacije ABTS [$\Delta A/h$] v odvisnosti od pH reakcijske mešanice. Prikazana so povprečja in standardne napake (N=3).

Hitrost anorganske oksidacije ABTS glede na naše meritve pada z višanjem pH, kot je razvidno že iz absolutnih vrednosti abiotske oksidacije ABTS.

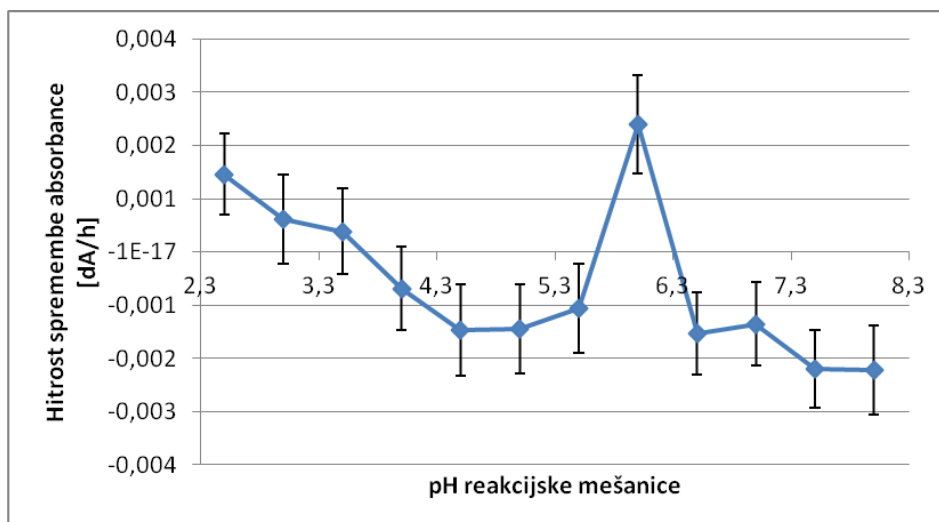
Vpliv pH na absorbanco raztopine tal brez dodanega ABTS

Preverili smo tudi vpliv pH na absorbanco pri valovni dolžini 420 nm v reakcijskih mešanicah, ki so vsebovale avtoklavirana tla brez dodanega ABTS (Priloga A3). V tleh se namreč nahajajo številne spojine, ki absorbirajo pri valovni dolžini 420 nm in tako vplivajo na meritve. Določili smo tudi kinetiko absorbance v časovnem intervalu ene ure v teh vzorcih (Priloga A4).



Priloga A3: Absorbanca raztopine vzorca tal pri 420 nm v odvisnosti od pH reakcijske mešanice. Prikazana so povprečja in standardne napake (N=3).

Vrednosti absorbance zapufrane raztopine tal naraščajo z višanjem pH reakcijske mešanice in dosežejo vrh pri pH 6,5. Ta trend je obraten trendu, ki smo ga izmerili v raztopini ABTS brez prisotnih tal. Primerjava vrednosti pH, ki najbolj ustrezajo uporabljenim v raziskavi pokaže, da se vrednost absorbance pri pH 4,0 signifikantno razlikuje od vrednosti 6,0 in 7,5 ($p < 0,01$), medtem ko se zadnji dve ne ($p = 0,23$).

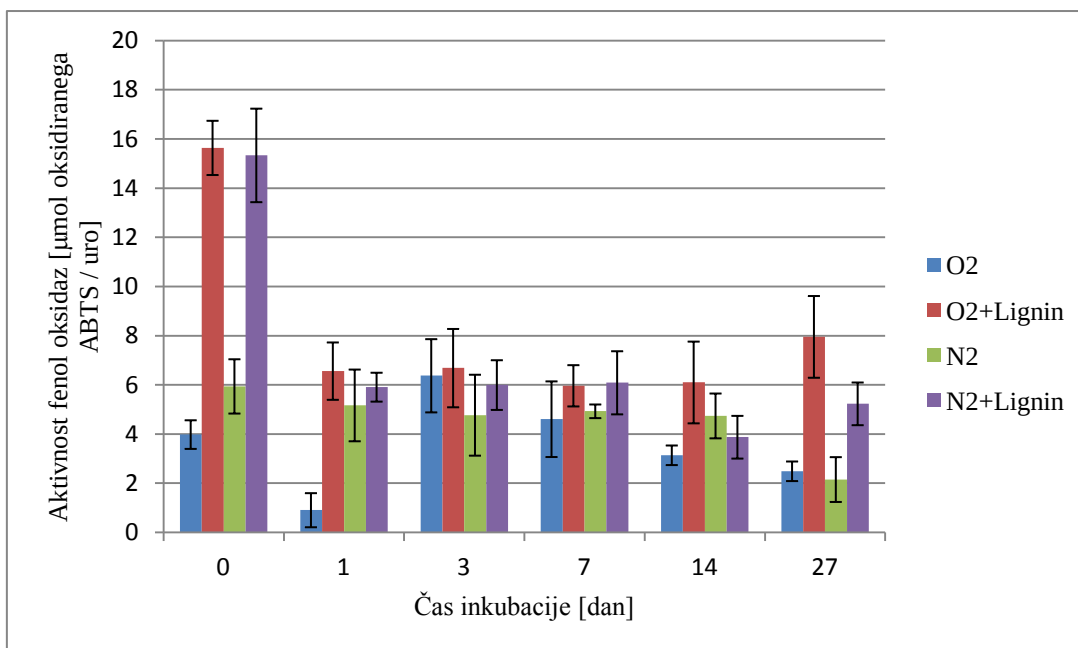


Priloga A4: Hitrost spremembe absorbance avtoklaviranih tal v odvisnosti od pH reakcijske mešanice. Prikazana so povprečja in standardne napake (N=3).

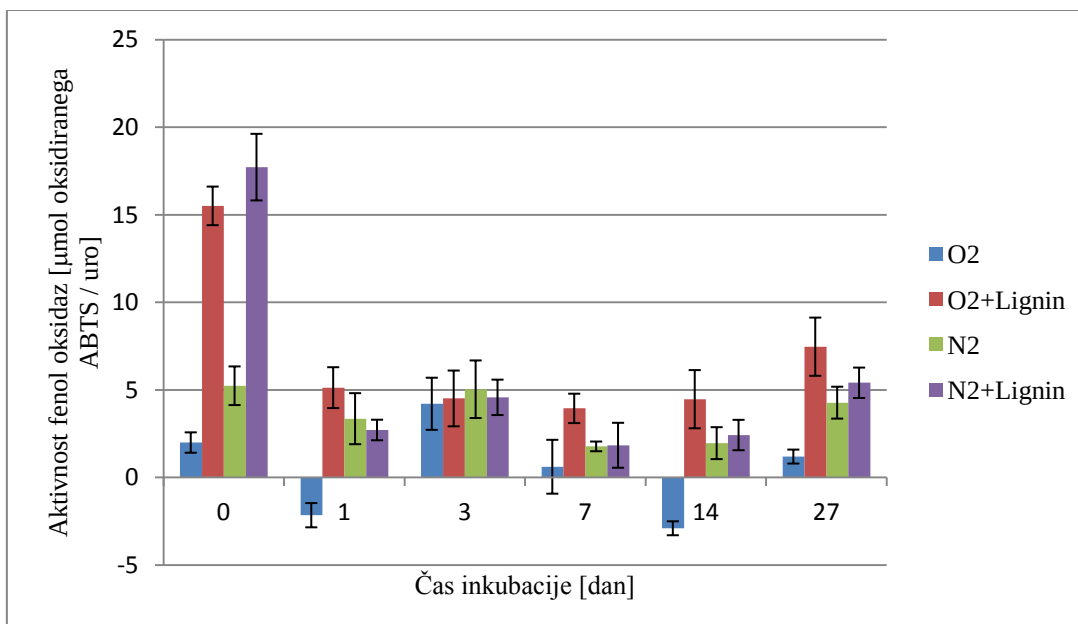
Kinetika zapufrane raztopine avtoklaviranih tal se v celotnem pH intervalu giblje okoli vrednosti 0. Kakršnokoli odstopanje (-0,004 do 0,004 $\Delta A/h$) je v rangi napake spektrofotometra.

Zaradi nizkih absolutnih izmerjenih vrednosti absorbance pri testu aktivnosti fenol oksidaz, smo želeli oceniti vpliv različnih dejavnikov, ki bi lahko motili naše meritve. Ti rezultati so povzeti v prilogi. Z merjenjem absorbance vodne raztopine ABTS pri valovni dolžini 420 nm smo pokazali, da pH vpliva na anorgansko razgradnjo ABTS in sicer se manjša z višanjem pH, vendar so razlike majhne in jih pri končnih rezultatih upoštevamo z odštetjem avtoklaviranih kontrol. Prav tako pH vpliva na absorbanco pri valovni dolžini 420 nm puferirane raztopine vzorca tal brez dodanega substrata ABTS. Ravno obratno kot pri anorganski razgradnji ABTS se z višanjem pH absorbanca tu viša. Predpostavljamo, da napako zaradi anorganske razgradnje ABTS in drugih snovi v tleh, ki absorbirajo pri valovni dolžini 420 nm, prav tako minimiziramo z odštetjem avtoklavirane negativne kontrole.

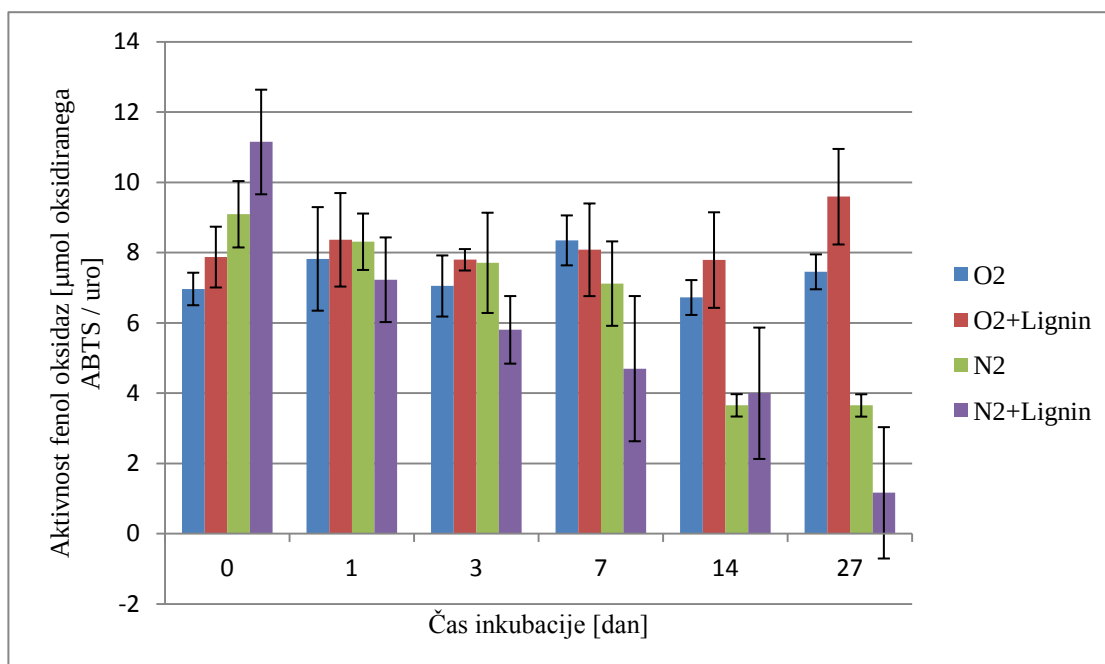
Ker priprava reakcijske mešanice poteka več kot eno uro, smo preverili tudi kinetiko anorganskega razpada ABTS v tleh ter absorbance vzorca tal brez ABTS v časovnem okviru ene ure. Medtem ko se absorbanca tal brez ABTS skozi čas ne spreminja, absorbanca vodne raztopine tal z ABTS narašča s povprečno hitrostjo 0,03/h in je odvisna od pH (pri pH 2,5 narašča 25 % hitreje kot pri pH 8). Vendar predpostavljamo, da te napake v meritvah minimaliziramo s tem, ko se držimo načrtanih časovnih okvirov med izvajanjem metode.



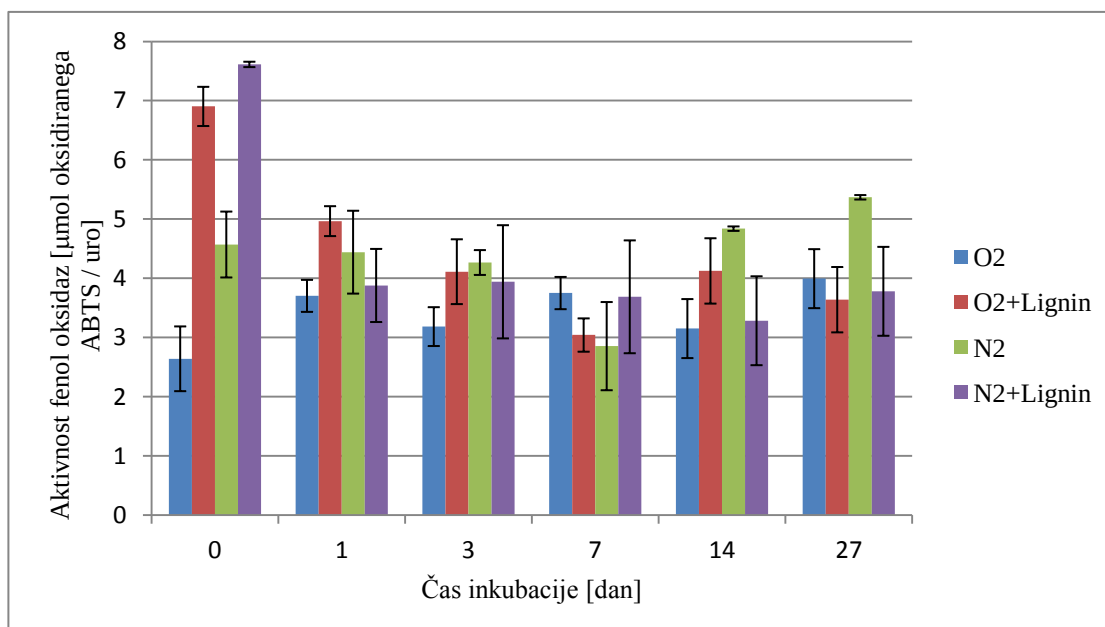
Priloga B1: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, A vzorec tal, pH 5,8. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O₂) ali anaerobno (N₂) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka (N=3).



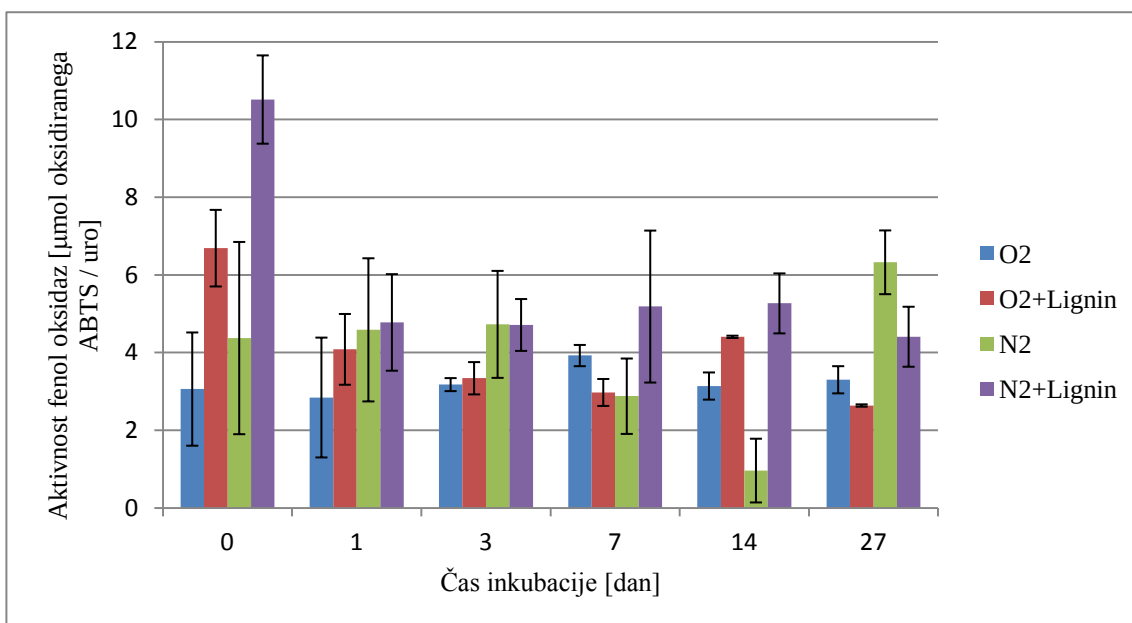
Priloga B2: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, A vzorec tal, pH 7,6. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O₂) ali anaerobno (N₂) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka (N=3).



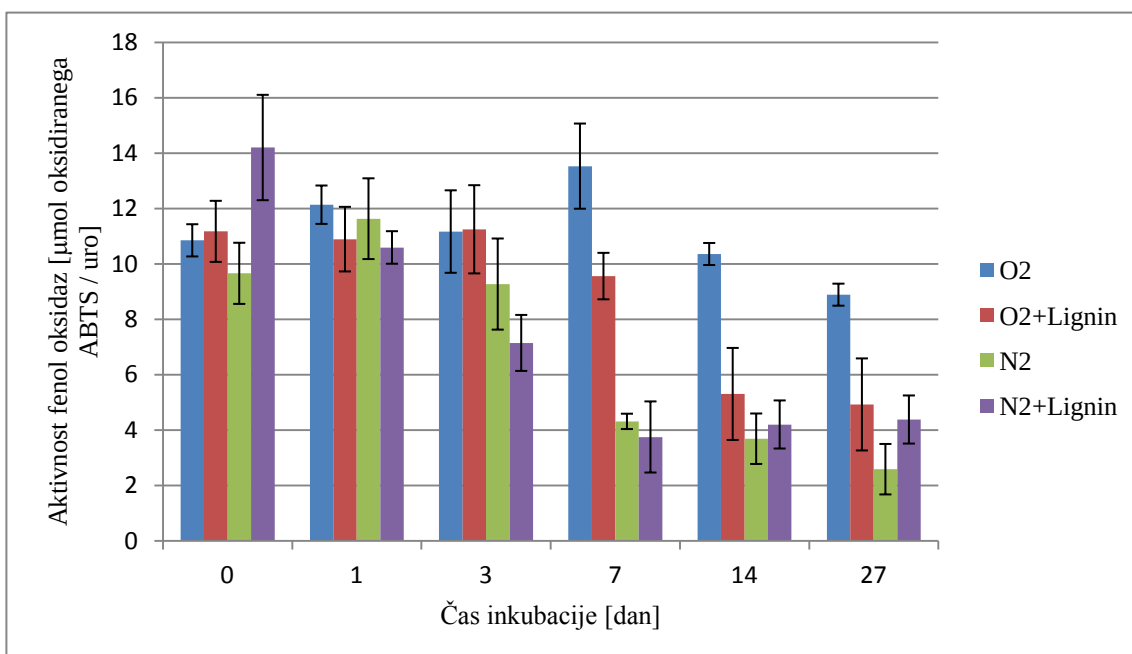
Priloga B3: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, B vzorec tal, pH 4,0. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O2) ali anaerobno (N2) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka ($N=3$).



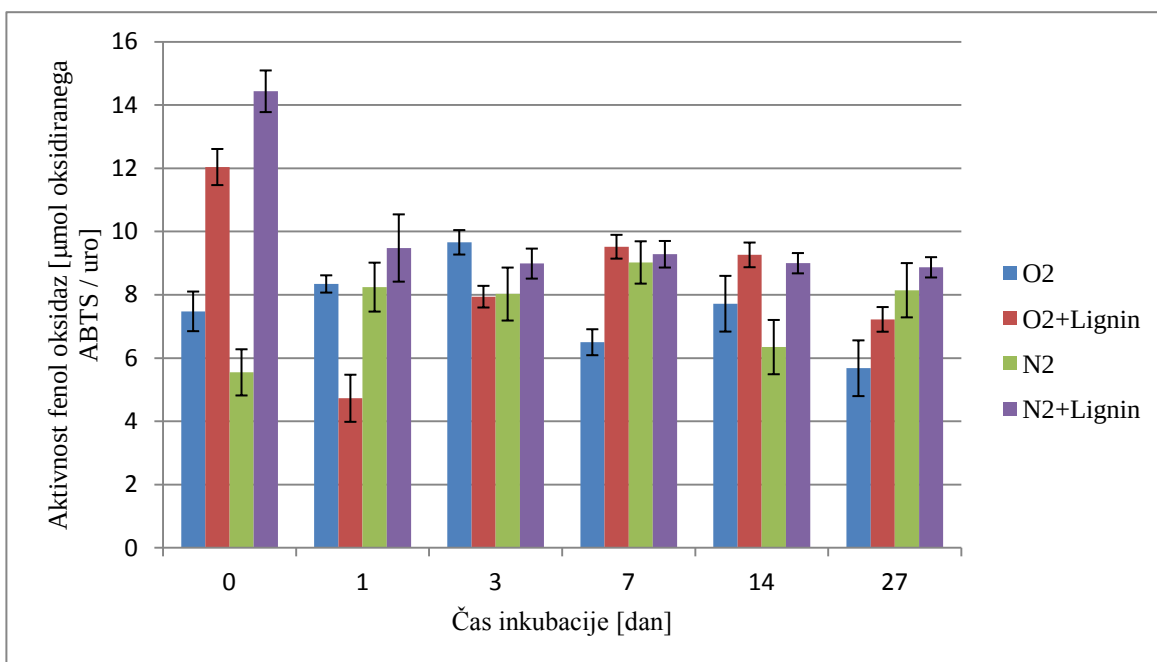
Priloga B4: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, B vzorec tal, pH 5,8. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O2) ali anaerobno (N2) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka ($N=3$).



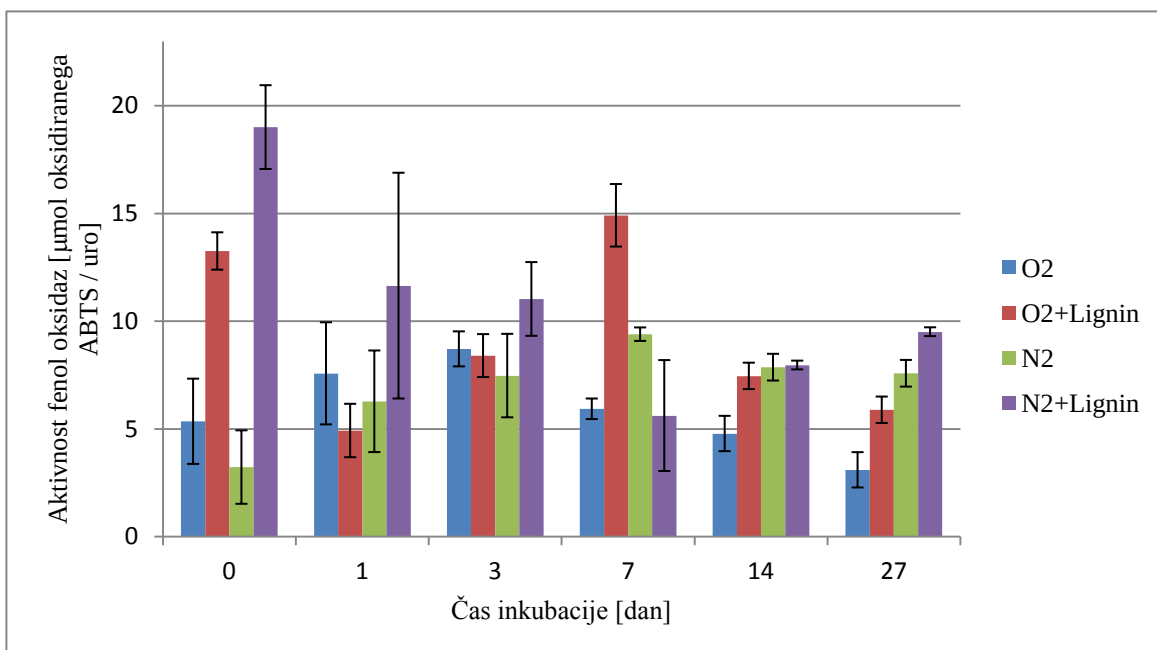
Priloga B5: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, B vzorec tal, pH 7,6. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O2) ali anaerobno (N2) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka ($N=3$).



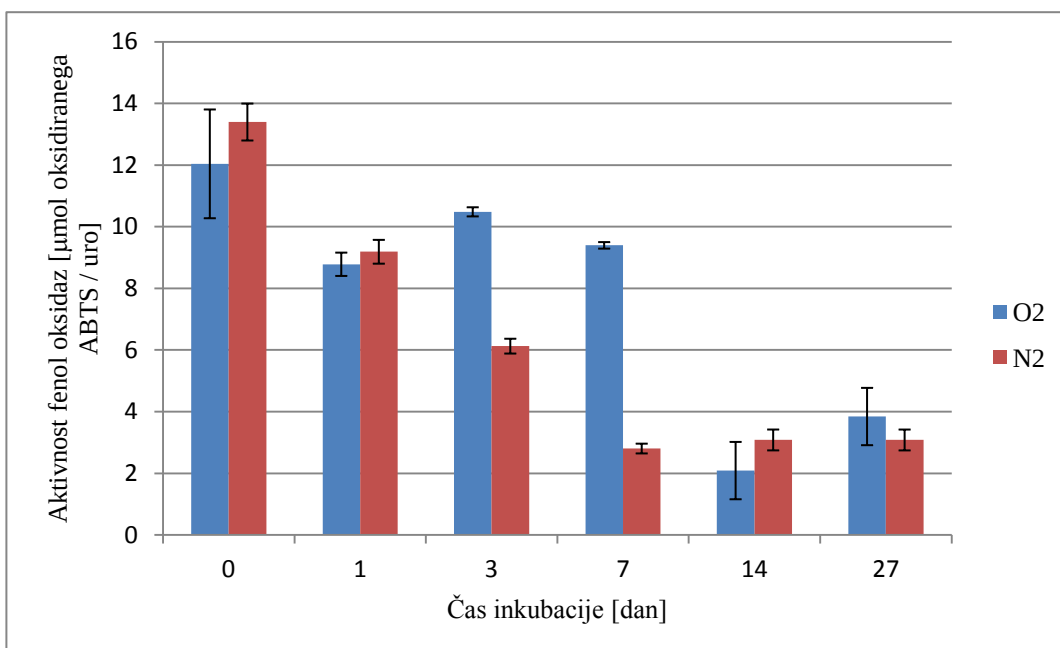
Priloga B6: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, C vzorec tal, pH 4,0. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O2) ali anaerobno (N2) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka ($N=3$).



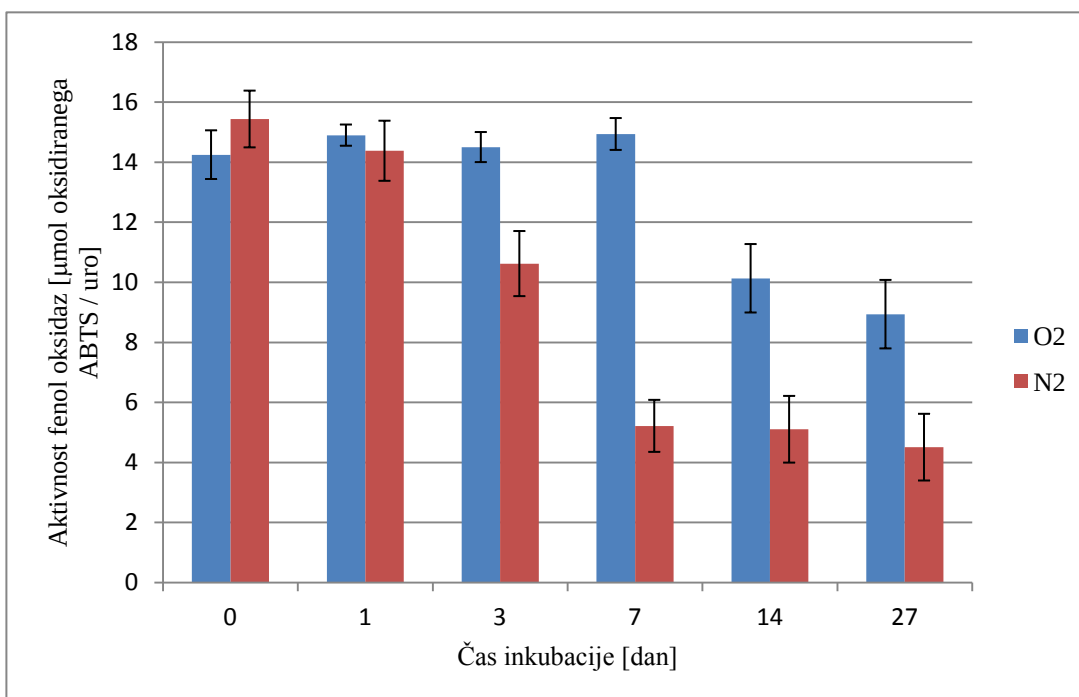
Priloga B7: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, C vzorec tal, pH 5,8. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O2) ali anaerobno (N2) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka ($N=3$).



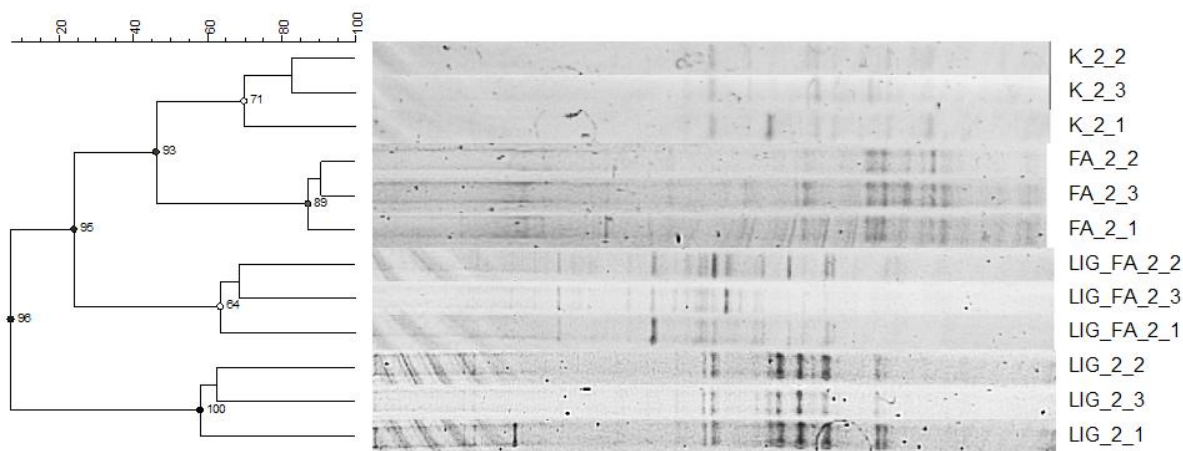
Priloga B8: Aktivnost fenol oksidaz, prvi poskus, C vzorec tal, pH 7,6. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O2) ali anaerobno (N2) z ali brez dodatka lignina (1 % masni delež). Predstavljena so povprečja in standardna napaka ($N=3$).



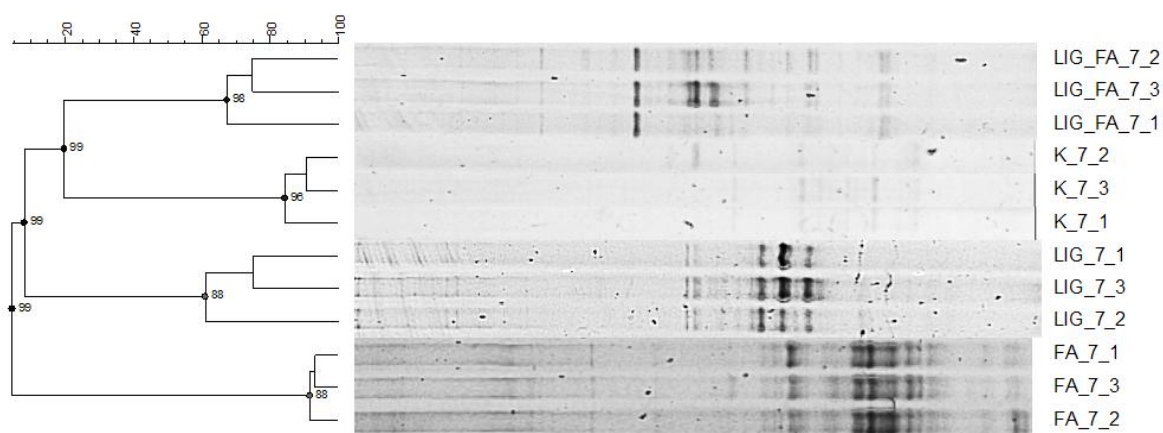
Priloga B9: Graf prikazuje aktivnost fenol oksidaz vzorca tal A pri pH reakcijske mešanice 4,0. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O₂) ali anaerobno (N₂). Predstavljena so povprečja in standardna napaka (N=3).



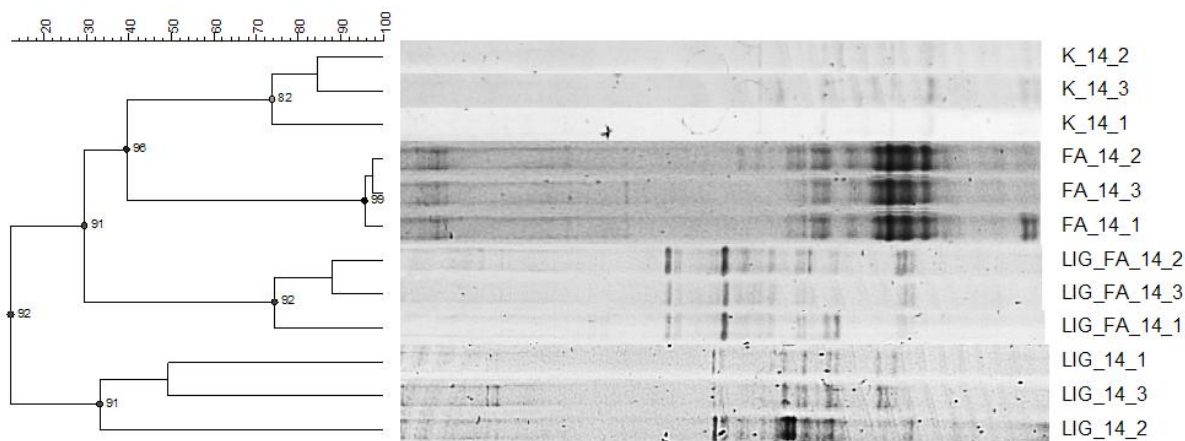
Priloga B10: Graf prikazuje aktivnost fenol oksidaz vzorca tal C pri pH reakcijske mešanice 4,0. Mikrokozmi so bili inkubirani aerobno (O₂) ali anaerobno (N₂). Predstavljena so povprečja in standardna napaka (N=3).



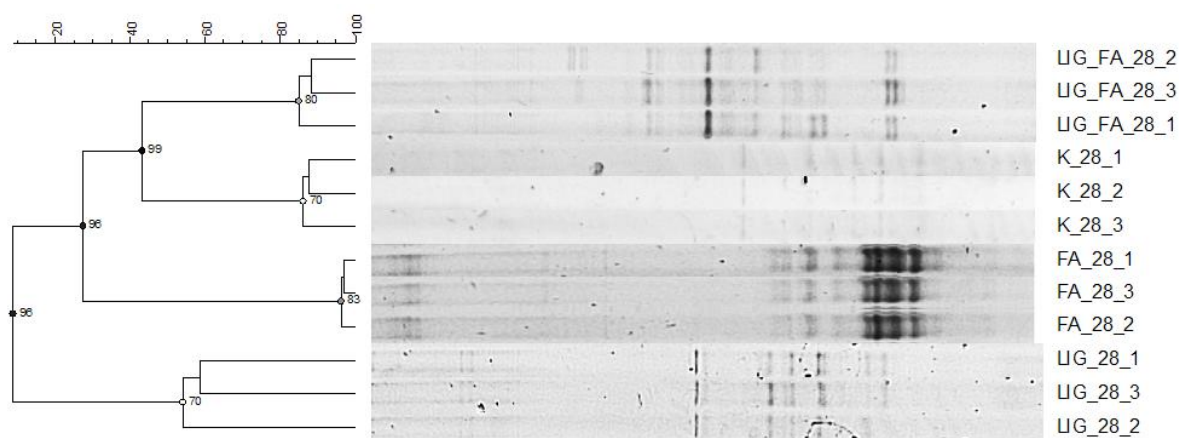
Priloga C1: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po dveh dneh inkubacije. Oznake vzorcev so sledeče: K - kontrolni mikrokozem z netretiranim vzorcem tal; LIG - mikrokozem z dodanim 1 % masnim deležem lignina; FA - mikrokozem z dodano ferulično kislino v končni koncentraciji 100 $\mu\text{mol/g}_{\text{suhih tal}}$; LIG_FA - mikrokozem z dodanim ligninom in ferulično kislino v zgoraj navedenih koncentracijah. Profili različnih tretmajev so bili združeni programsko. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.



Priloga C2: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po 7 dneh inkubacije. Oznake vzorcev so sledeče: K - kontrolni mikrokozem z netretiranim vzorcem tal; LIG - mikrokozem z dodanim 1 % masnim deležem lignina; FA - mikrokozem z dodano ferulično kislino v končni koncentraciji 100 $\mu\text{mol/g}_{\text{suhih tal}}$; LIG_FA - mikrokozem z dodanim ligninom in ferulično kislino v zgoraj navedenih koncentracijah. Profili različnih tretmajev so bili združeni programsko. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.



Priloga C3: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po 14 dneh inkubacije. Oznake vzorcev so sledeče: K - kontrolni mikrokozem z netretiranim vzorcem tal; LIG - mikrokozem z dodanim 1 % masnim deležem lignina; FA - mikrokozem z dodano ferulično kislino v končni koncentraciji 100 $\mu\text{mol/g}_{\text{suhih tal}}$; LIG_FA - mikrokozem z dodanim ligninom in ferulično kislino v zgoraj navedenih koncentracijah. Profili različnih tretmajev so bili združeni programsko. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.



Priloga C4: Prikaz DGGE profila genov za lakaze po 28 dneh inkubacije. Oznake vzorcev so sledeče: K - kontrolni mikrokozem z netretiranim vzorcem tal; LIG - mikrokozem z dodanim 1 % masnim deležem lignina; FA - mikrokozem z dodano ferulično kislino v končni koncentraciji 100 $\mu\text{mol/g}_{\text{suhih tal}}$; LIG_FA - mikrokozem z dodanim ligninom in ferulično kislino v zgoraj navedenih koncentracijah. Profili različnih tretmajev so bili združeni programsko. Uporabljen je bil program Bionumerics, Pearsonov korelacijski koeficient, UPGMA algoritem za izris fenetskega drevesa.