

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Bojan PAPIĆ

**BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL
METAGENOMSKIH KNJIŽNIC IZ MIKROBNIH
SKUPNOSTI KRAŠKIH JAM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Bojan PAPIĆ

**BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL METAGENOMSKIH KNJIŽNIC IZ
MIKROBNIH SKUPNOSTI KRAŠKIH JAM**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF METAGENOMIC
LIBRARIES FROM MICROBIAL MATS FROM CARBONATE
CAVES**

M. Sc. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, kjer so bili izvedeni vsi poskusi in kemijske analize.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Lejlo Pašić, za somentorico doc. dr. Blagajano Herzog Velikonja, za recenzenta pa doc. dr. Blaža Stresa.

Mentorica: doc. dr. Lejla Pašić
Somentorica: doc. dr. Blagajana Herzog Velikonja
Recenzent: doc. dr. Blaž Stres

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: doc. dr. Lejla PAŠIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Blagajana HERZOG VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Blaž STRES
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Bojan Papić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.25/.26:602.6:575.112(043)=163.6
KG	mikrobna ekologija/mikrobne združbe/jamska mikrobiologija/metagenomika/metagenomske knjižnice/bioinformatika/biotehnološki potencial/bioaktivne snovi
AV	PAPIĆ, Bojan, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	PAŠIĆ, Lejla (mentorica)/HERZOG VELIKONJA, Blagajana (somentorica)/STRES, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2015
IN	BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL METAGENOMSKIH KNJIŽNIC IZ MIKROBNIH SKUPNOSTI KRAŠKIH JAM
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XI, 78 str., 11 pregl., 20 sl., 167 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AB	Metagenomika omogoča vpogled v funkcijsko in vrstno raznolikost mikroorganizmov v danem okolju brez potrebe po njihovem gojenju, ter odkrivanje novih biotehnološko uporabnih encimov in naravnih produktov. Kraške jame naseljujejo mikroorganizmi, ki so potencialni producenti biotehnološko zanimivih bioaktivnih snovi in encimov. Iz rožnatih in sivih mikrobnih prevlek v Pajsarjevi jami (Slovenija) smo izdelali dve metagenomski fozmidni knjižnici, ki sta vsebovali 70.000 in 500 klonov. S presejalnimi testi 374.500 klonov iz metagenomskih knjižnic na trdnih indikatorskih gojiščih smo identificirali en klon s potencialno lipolitično aktivnostjo. Da bi opredelili, ali imajo jamski mikroorganizmi biotehnološki potencial, smo vzporedno analizirali jamski metagenom »Echo Passage«, v katerem so zbrana zaporedja mikroorganizmov, ki naseljujejo kapnike v jami »Kartchner caverns« (Arizona, ZDA). Bioinformacijska analiza je pokazala, da med bakterijami, ki naseljujejo jamske kapnike, prevladujejo predstavniki Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria in Chloroflexi, medtem ko med arhejami prevladujejo arheje iz debla Thaumarchaeota (taumarheje). Nadalje je bioinformacijska analiza jamskega metagenoma pokazala, da imajo taumarheje pomembno vlogo v biogeokemiji jamskega ekosistema kot primarni producenti (kemolitotrofi), ki fiksirajo CO ₂ po energetsko učinkoviti 3-hidroksipropionat/4-hidroksibutiratni poti in oksidirajo amonijak v procesu nitrifikacije. Filogenetska analiza izbranih taumarhejskih zaporedij je pokazala, da je večina jamskih taumarhej sorodnih taumarhejam iz rodu <i>Nitrososphaera</i> . Bioinformacijska analiza metagenomskih zaporedij ketosintaznih in kondenzacijskih domen v poliketid-sintazah in sintazah neribosomskih peptidov je pokazala, da so jamski mikrobi potencialni producenti novih poliketidov in neribosomskih peptidov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Du2
DK UDC 579.25/.26:602.6:575.112(043)=163.6
KG microbial ecology/microbial communities/cave microbiology/metagenomics/
metagenomic libraries/bioinformatics/biotechnological potential/bioactive
compounds
AV PAPIĆ, Bojan
SA PAŠIĆ, Lejla (supervisor)/ HERZOG VELIKONJA, Blagajana (co-advisor)/
STRES, Blaž (reviewer)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
LI 2015
IN BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF METAGENOMIC LIBRARIES
FROM MICROBIAL MATS FROM CARBONATE CAVES
TD M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
OP XI, 78 p., 11 tab., 20 fig., 167 ref.
IJ sl
JI sl/en
AB Metagenomics provides an insight into functional and species diversity of
microorganisms in a given environment while bypassing the need of their
cultivation. It also represents a tool for the discovery of novel enzymes and natural
products of biotechnological importance. Karst caves are inhabited by
microorganisms that are potential producers of novel enzymes and natural products.
In this thesis, two metagenomic fosmid libraries were constructed from pink
(70,000 clones) and gray (500 clones) microbial mats in karst cave Pajsarjeva jama
(Slovenia). Screening of 374.500 clones from metagenomic libraries on solid
indicator plates led to the identification of one clone with putative lipolytic activity.
In order to determine whether the cave organisms harbor biotechnological potential,
cave metagenome »Echo Passage« was analysed in parallel. »Echo Passage
Metagenome« represents sequences of microorganisms that inhabit the cave
stalactites in Kartchner caverns (AZ, USA). Bioinformatic analysis showed that
microbial community of cave stalactites in Katchner caverns is dominated by
Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and Chloroflexi, while Thaumarchaeota
was the most abundant archaeal phylum. Moreover, the cave metagenome analysis
showed that Thaumarchaeota play an important role in the biogeochemistry of cave
ecosystems as primary producers (chemolithoautotrophs) that use energy-efficient
3-hydroxypropionate/4-hydroxybutirate cycle for CO₂ fixation and oxidize
ammonia in the process of nitrification. Phylogenetic analyses of the selected
taumarchaeal sequences showed that the majority of Thaumarchaeota were related
to the genus *Nitrososphaera*. Bioinformatics analysis of metagenomic ketosynthase
and condensation domains in polyketide synthases and nonribosomal peptide
synthases revealed that cave microbes are potential producers of novel polyketides
and nonribosomal peptides.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IIIX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVAR	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA	1
1.2 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKEGA DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 JAMSKI MIKROORGANIZMI IN NJIHOV BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL	3
2.1.1 Jame kot habitat mikroorganizmov	3
2.1.2 Raznolikost mikroorganizmov, ki naseljujejo jamsko srebro	3
2.1.3 Encimi in naravni produkti biotehnoškega pomena	4
2.1.4 Biotehnoški potencial jamskih mikroorganizmov	7
2.2 METAGENOMIKA	7
2.2.1 Izolacija metagenomske DNA	9
2.2.2 Fozmidi kot vektorji za izdelavo metagenomskih knjižnic	9
2.2.3 Prednosti in pomanjkljivosti <i>E. coli</i> kot gostitelja	10
2.2.4 Opredelitev kvalitete metagenomske knjižnice	11
2.2.5 Presejalni testi metagenomskih knjižnic za preiskovane lastnosti	12
2.2.6 Pomanjkljivosti presejalnih metod, ki temeljijo na indikatorskih gojiščih	12
2.2.7 Pomanjkljivosti iskanja novih neribosomskih peptidov in poliketidov s pristopom funkcijske metagenomike	13
2.3 BIOINFORMACIJSKA ANALIZA METAGENOMSKIH ZAPOREDIJ	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 SHEMA POTEKA DELA	16
3.2 KEMIČNE IN DROBNA OPREMA	16
3.3 RAZTOPINE, PUFRI	18
3.4 BAKTERIJSKI IN GLIVNI SEVI	19
3.5 GOJIŠČA	19
3.6 PRESEJALNI TESTI ZA ZAZNAVO ENCIMSKE AKTIVNOSTI	20
3.7 PRESEJALNI TESTI ZA ZAZNAVO PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI	21
3.8 PRESEJALNI TEST ZA ZAZNAVO KLONOV S SPREMENJENO MORFOLOGIJO ALI PIGMENTACIJO	22
3.9 VZORČENJE	22
3.10 IZOLACIJA OKOLJSKE DNA IZ JAMSKIH MIKROBNIH PREVLEK	22
3.11 IZOLACIJA FOZMIDNE DNA	23
3.12 UGOTAVLJANJE ČISTOSTI IN KONCENTRACIJE DNA	23
3.13 PRIPRAVA IN ANALIZA KLONSKIH KNJIŽNIC GENOV ZA 16S rRNA	24
3.14 PRIPRAVA METAGENOMSKIH FOZMIDNIH KNJIŽNIC IZ ROŽNATIH IN SIVIH JAMSKIH MIKROBNIH PREVLEK	24
3.15 PRIPRAVA ELEKTROKOMPETENTNIH CELIC <i>E. coli</i> IN ELEKTROPORACIJA	26
3.16 PRIPRAVA KEMIČNO KOMPETENTNIH CELIC <i>E. coli</i> S CaCl_2 IN TRANSFORMACIJA	26
3.17 DOLOČITEV RESTRIKCIJSKEGA PROFILA VKLJUČKOV FOZMIDNE DNA	26

3.18	POTRJEVANJE PRISOTNOSTI ZAPISA ZA AKTIVNOST V VKLJUČKIH POZITIVNIH KLONOV	27
3.19	<i>In silico</i> ANALIZE.....	27
4	REZULTATI	30
4.1	IZOLACIJA OKOLJSKE DNA.....	30
4.2	PRIPRAVA KLONSKÉ KNJÍŽNICE OKOLJSKIH GENOV ZA 16S rRNA IZ ROŽNATIH MIKROBNIH PREVLEK	30
4.3	OCENE KVALITETE FOZMIDNE KNJÍŽNICE	35
4.4	OPREDELITEV L-ARABINOZE KOT AVTOINDUKTORJA pCC1FOS.....	36
4.5	OPTIMIZACIJA IZOLACIJE FOZMIDNE DNA	37
4.6	PRESEJALNI TESTI KLONOV FOZMIDNIH KNJÍŽNIC ZA ZAZNAVO HIDROLITIČNE IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI.....	38
4.6.1	Amilazna aktivnost.....	39
4.6.2	Beta-glukozidazna aktivnost	39
4.6.3	Endoglukanazna aktivnost (hidroliza CMC).....	40
4.6.4	Esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza tributirina)	41
4.6.5	Esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza detergentov Tween 20 in Tween 80)....	42
4.6.6	Lipazna aktivnost (hidroliza olivnega olja).....	43
4.6.7	Hitinazna aktivnost (hidroliza koloidnega hitina).....	44
4.6.8	Ksilanazna aktivnost (hidroliza ksilana)	44
4.6.9	Protibakterijska aktivnost proti <i>E. coli</i>	44
4.6.10	Protibakterijska aktivnost proti <i>B. subtilis</i>	44
4.6.11	Protiglivična aktivnost proti <i>S. cerevisiae</i>	45
4.6.12	Spremenjena morfoloĝija ali pigmentacija	45
4.7	EMPIRIČNA OPREDELITEV NAPORA PREGLEDOVANJA METAGENOMSKE KNJÍŽNICE	46
4.7.1	Vpliv velikosti prokariotskih genomov v vzorcu na napor pregledovanja	46
4.7.2	Vpliv velikosti preiskovanih fragmentov na napor pregledovanja.....	47
4.8	ANALIZA METAGENOMA »ECHO PASSAGE«.....	48
4.8.1	Taksonomska analiza metagenoma »Echo Passage«	49
4.8.2	Filogenomska analiza metagenomskih funkcijskih označevalcev, udeleženih v primarni produkciji	51
4.8.3	Analiza genov za encime in naravne produkte biotehnoškega pomena	54
5	RAZPRAVA	58
5.1	VZORČENJE.....	58
5.2	IZOLACIJA METAGENOMSKE DNA	58
5.3	TEHNIČNE POSEBNOSTI PRI PRIPRAVI IN ANALIZI KLONSKIH KNJÍŽNIC....	59
5.4	NAVIDEZNO POZITIVNI IN NAVIDEZNO NEGATIVNI KLONI FOZMIDNE KNJÍŽNICE PRI PREGLEDOVANJU KLONOV Z α -KOMPLEMENTACIJO.....	60
5.5	KLON K10 lip+ Z DOMNEVNO LIPOLITIČNO AKTIVNOSTJO.....	62
5.6	BIOINFORMACIJSKA ANALIZA METAGENOMSKIH KETOSINTAZNIH IN KONDENZACIJSKIH DOMEN	62
5.7	<i>In silico</i> ANALIZA FUNKCIJSKIH OZNAČEVALCEV, KI SO UDELEŽENI V PRIMARNI PRODUKCIJI.....	63
6	SKLEPI	65
7	POVZETEK.....	66
8	VIRI.....	67
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primeri uporabnosti metagenomike na številnih področjih aktivnosti v biotehnologiji (povzeto po DaSilva, 2004).	8
Preglednica 2: Seznam uporabljenih bakterijskih in glivnih sevov.....	19
Preglednica 3: Diferencialna indikatorska trdna gojišča, ki smo jih uporabili za zaznavo encimske aktivnosti	20
Preglednica 4: Koncentracija fozmidne DNA, ki smo jo s kompletom Miniprep (Qiagen) izolirali iz 5 ml inducirane (komercialna avtoindukcijska raztopina oz. L-arabinoza) in neinducirane prekonočne kulture naključno izbranega klona fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek	37
Preglednica 5: Povprečna koncentracija in čistost fozmidne DNA, ki smo jo izolirali s tremi različnimi metodami iz 3 ml prekonočne kulture klonov iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek.	38
Preglednica 6: Rezultati presejalnih testov klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek	38
Preglednica 7: Rezultati presejalnih testov klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek	39
Preglednica 8: Primer izračuna vpliva dolžine gena za preiskovane hidrolaze na napor pregledovanja.....	48
Preglednica 9: Funkcijski označevalci za primarno produkcijo, katerih metagenomska zaporedja smo filogenetsko umestili na referenčna filogenetska drevesa z algoritmom RAxML EPA	52
Preglednica 10: Domnevne metagenomske ketosintazne (KS) domene, ki smo jih identificirali z orodjem NaPDoS, in njim najpodobnejša zaporedja znotraj podatkovnih zbirk NaPDoS (algoritem BlastP) in »NCBI NR proteins« (algoritem BlastX).	55
Preglednica 11: Domnevna metagenomska kondenzacijska (C) domena, ki smo jo identificirali z orodjem NaPDoS, in njim najpodobnejša zaporedja znotraj podatkovnih zbirk NaPDoS (algoritem BlastP) in »NCBI NR proteins« (algoritem BlastX).	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Restriksijska karta fozmidnega vektorja pCC1FOS (karta ne prikazuje vseh prepoznavnih mest za restriksijske endonukleaze z enim prepoznavnim mestom) (Epicentre, 2012a)	10
Slika 2: Strategije taksonomskega pripisa metagenomskim zaporedjem (povzeto po Bazinet in Cummings, 2012)	14
Slika 3: Shematski prikaz poteka dela	16
Slika 4: Shema priprave fozmidne knjižnice (Cruz in sod., 2010: 1473)	25
Slika 5: Shema potrjevanja prisotnosti zapisa za aktivnost v vključkih pozitivnih klonov iz fozmidne knjižnice	27
Slika 6: Okoljska DNA iz sivih mikrobnih prevlek, ločena v 1-odstotnem agaroznem gelu s PFGE	30
Slika 7: Elektroforezna ločitev pomnožkov genov za 16S rRNA iz okoljske DNA iz rožnatih mikrobnih prevlek	31
Slika 8: Filogenetsko drevo proteobakterijskih genov za 16S rRNA iz rožnatih mikrobnih prevlek iz Pajsarjeve jame in jame Vjetrenica	33
Slika 9: Filogenetsko drevo ne-proteobakterijskih genov za 16S rRNA iz rožnatih mikrobnih prevlek iz Pajsarjeve jame in jame Vjetrenica	34
Slika 10: Restriksijski profil (<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>) fozmidne DNA iz navidezno pozitivnih in navidezno negativnih klonov pri modro-belem testu iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek	35
Slika 11: Restriksijski profil (<i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i>) fozmidne DNA iz 11 naključno izbranih klonov iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek	36
Slika 12: Elektroforezna ločitev fozmidne DNA iz inducirane in neinducirane naključno izbranega klona fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek v 0,6-odstotnem agaroznem gelu	37
Slika 13: Pojav črnih (beta-glukozidaza pozitivnih) papil na belih (beta-glukozidaza negativnih) kolonijah po štiridnevni inkubaciji indikatorskih gojišč pri 37 °C (levo). Papile so ob ponovni nacepiti na diferencialno gojišče stabilno izkazovale beta-glukozidazno aktivnost po enodnevni inkubaciji gojišč pri 37 °C, medtem ko gostiteljski sev EPI300-T1 ^R s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka (zgoraj) ni izkazoval beta-glukozidazne aktivnosti (desno).	40
Slika 14: Potrjen klon K10 lip+ iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek z lipolitično aktivnostjo na gojišču s tributirinom	42
Slika 15: Esterazna aktivnost samega gostiteljskega seva EPI300-T1 ^R na gojišču z 1-odstotnim detergentom Tween 20 po dvodnevni inkubaciji pri 37 °C	43
Slika 16: Fotografija kolonij klona z domnevno spremenjeno morfologijo iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek	46
Slika 17: Odvisnost napora pregledovanja (<i>N</i>) od velikosti prokariontskega genoma (Mbp).	47
Slika 18: Odvisnost napora pregledovanja (<i>N</i>) od dolžine zaporedja, na katerem je iskana lastnost zapisana (kbp)	48
Slika 19: Taksonomska sestava metagenoma »Echo Passage« na nivoju domen, ki smo jo opredelili z orodji NCB Classifier, IMG/M, MG-RAST in AMPHORA	50
Slika 20: Taksonomska sestava metagenoma »Echo Passage« na nivoju debel, ki smo jo opredelili z orodjem AMPHORA	50

KAZALO PRILOG

- Priloga A:** Seznam nekaterih aktinobakterijskih vrst, ki so bile opisane v jamah
- Priloga B:** V celoti sekvencirani bakterijski genomi, grupirani glede na njihovo velikost
- Priloga C:** V celoti sekvencirani arhejski genomi, grupirani glede na njihovo velikost
- Priloga D:** Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA iz metagenoma »Echo Passage«
- Priloga E:** Filogenetsko drevo arhejskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA iz metagenoma »Echo Passage«
- Priloga F:** Taksonomska uvrstitev arhejskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA z orodji MLTreeMap, RDP Classifier in RAxML EPA
- Priloga G:** Taksonomska uvrstitev bakterijskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA z orodji MLTreeMap, RDP Classifier in RAxML EPA
- Priloga H:** Filogenetsko drevo taumarhejskih metagenomskih podenot A amonij-monooksigenaz (AmoA)
- Priloga I:** Filogenetsko drevo metagenomskih 4-hidroksibutirat-CoA-dehidrataz (4HBD)
- Priloga J:** Filogenetsko drevo metagenomskih proteobakterijskih encimov SoxB, udeleženih pri litotrofni oksidaciji reduciranih žveplovih spojin po Sox-poti
- Priloga K:** Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih podenot A amonij-monooksigenaz (AmoA) in metan-monooksigenaz (PmoA), udeleženih pri nitrifikaciji (AmoA) in metanotrofiji (PmoA)
- Priloga L:** Filogenetsko drevo velike podenote metagenomskih encimov RuBisCO (CbbL), udeleženih v Calvin-Bensonovem ciklu fiksacije CO₂
- Priloga M:** Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih ATP-citrat-liaz (AclB), udeleženih v reduktivnem ciklu trikarboksilnih kislin fiksacije CO₂
- Priloga N:** Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih fosforibulokinaz (Prk), udeleženih v Calvin-Bensonovem ciklu fiksacije CO₂
- Priloga O:** Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih majhnih podenot encima RuBisCO (CbbS), udeleženih v Calvin-Bensonovem ciklu fiksacije CO₂
- Priloga P:** Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih hidroksilamin-oksidoreduktaz (Hao)/ hidrazin-oksidoreduktaz (Hzo), udeleženih v bakterijski aerobni oksidaciji amonijaka (Hao) in anaerobni oksidaciji amonijaka (Hzo)
- Priloga R:** Filogenetsko drevo metagenomskih podenot A reduktaz adenzin-5'-fosfosulfata (AprA), udeleženih v anaerobni sulfatni respiraciji in aerobni litotrofni oksidaciji sulfita po APS-poti
- Priloga S:** Ocena velikosti gruč genov (biosinteznih poti) PKS/NRPS na primeru 10 različnih bakterijskih sekundarnih metabolitov
- Priloga T:** Funkcijska klasifikacija in filogenetska uvrstitev domnevnih ketosintaznih (KS) domen iz metagenoma »Echo Passage« (rdeči tisk) z orodjem NaPDoS
- Priloga U:** Funkcijska klasifikacija in filogenetska uvrstitev domnevne kondenzacijske (C) domene (rdeči tisk) iz metagenoma »Echo Passage« z orodjem NaPDoS
- Priloga V:** Klasifikacija ketosintaznih (KS) domen v PKS z orodjem NaPDoS
- Priloga Z:** Klasifikacija kondenzacijskih (C) domen v NRPS z orodjem NaPDoS

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
acetil-CoA	acetilkoencim A
Ara	L-arabinoza
AT	adenin–timin
ATP	adenozin-trifosfat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	bazni par
Cm	kloramfenikol
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	deoksiribonukleozid trifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FAS	sintaza maščobnih kislin (ang. <i>fatty acid synthase</i>)
FKI	fenol: kloroform : izoamilalkohol
GlcNAc	N-acetilglukozamin
HB	4-hidroksibutirat
HMM	skriti model Markova (ang. <i>Hidden Markov model</i>)
HP	3-hidroksipropionat
kbp	kilobazni par
KI	kloroform : izoamilalkohol
LB	gojišče Luria Bertani
NRPS	sintaza neribosomskih peptidov (ang. <i>nonribosomal peptide synthase</i>)
OD	optična gostota
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (ang. <i>pulse-field gel electrophoresis</i>)
PKS	poliketid-sintaza
pribl.	približno
PUFA	večkrat nenasičena maščobna kislina (ang. <i>polyunsaturated fatty acid</i>)
RuBisCO	karboksilaza/oksigenaza ribuloza-1,5-bisfosfata
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
t. i.	tako imenovan
TBE	pufer tris–borat–EDTA
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
UV	ultravijolična svetloba

SLOVAR

Aktinomicete so aktinobakterije iz reda Actinomycetales.

Antibiotik smo v tem delu definirali kot katero koli organsko spojino (bioaktivno snov), ki zavira ali ubije mikrobo preko specifičnih interakcij z mikrobno (bakterijsko) tarčo, ne glede na njen izvor, ki je lahko naraven, polysintezen ali sintezen (Davies J. in Davies D., 2010).

Endiin je spojina z dvema trojnima vezema, ki ju ločuje ena dvojna vez. Nekateri naravni produkti so endiini, ki pogosto delujejo citotoksično.

Metoda največjega verjetja je metoda rekonstrukcije filogenetskega drevesa, ki išče drevo z največjim verjetjem. Verjetje je v evolucijskem kontekstu verjetnost, da je pri dani hipotezi (topologiji drevesa in izbranem evolucijskem modelu) evolucija vodila v nastanek naših podatkov (poravnave več zaporedij).

Transkripcijska interferenca je pojav, ko eden od transkripcijskih procesov neposredno in v *cis* deluje zaviralno na drugi transkripcijski proces. Pogosto močan promotor zavira delovanje šibkega promotorja.

Večkratno odporne bakterije so bakterije, ki so odporne proti trem ali več skupinam antibiotikov.

1 UVOD

1.1 NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

V zadnjih letih na globalnem trgu narašča potreba po novih industrijskih encimih z izboljšanimi lastnostmi. V iskanju trajnostnih rešitev se vse več industrijskih panog preusmerja iz kemično- na biokemično (encimsko) katalizirane procese in izrabo obnovljivih virov energije (Adrio in Demain, 2014). S potrebo po spremembah se srečujejo tudi v javnem zdravstvu, kjer grožnja predstavlja naraščajoče število okužb z večkratno odpornimi bakterijami, zato je nujno odkrivanje novih antibiotikov (Gadakh in Van Aerschot, 2015).

Ključnega pomena za reševanje zgoraj navedenih problemov je poznavanje vrstne pestrosti mikroorganizmov. Običajne gojitvene tehnike s svojimi pogoji gojenja, prekinitvami interakcij med mikrobi, izpostavitvijo kisiku in pomanjkanju gradientov niso primerne za opredelitev celotne mikrobne pestrosti v izbranem okolju. Navkljub izboljšavam gojitvenih tehnik večine (> 99 %) mikroorganizmov iz okolij izven živalskih gostiteljev z običajnimi tehnikami gojenja v laboratorijskih razmerah ne moremo vzgojiti v čisti kulturi (Staley in Konopka, 1985). Prav ta del mikrobioma naj bi predstavljal še velik in neizkoriščen vir novih biotehnološko uporabnih spojin. Metagenomski pristop omogoča vpogled v celotno funkcijsko in vrstno pestrost mikroorganizmov v danem okolju brez potrebe po njihovem gojenju, saj sloni na analizi okoljske DNA. Z metagenomskim pristopom lahko identificiramo nove industrijske encime in naravne produkte z biotehnološkim potencialom. Metagenomika je nepogrešljiva tudi na področju mikrobne ekologije, saj omogoča vpogled v celotno mikrobno raznolikost v danem okolju in napoved potencialne funkcije posameznih mikrobnih skupin v mikrobni združbi (Culligan in sod., 2014).

Jame veljajo za skrajna okolja, za katera sta značilni pomanjkanje hranil (oligotrofija) in odsotnost svetlobe. Iz mikrobiološkega in metagenomskega vidika so jamska okolja slabo raziskana, vendar privlačna kot vir za iskanje novih spojin z biotehnološkim potencialom (Lee in sod., 2012). Dosedanje mikrobiološke raziskave jam so pokazale, da imajo mikrobi pomembno vlogo v biogeokemiji jam in sodelujejo pri procesih speleogeneze (Cuezva in sod., 2013; Lee in sod., 2012). Zato smo se v okviru magistrske naloge odločili opredeliti biotehnološki potencial specifičnih mikrobnih prevlek, ki jih najdemo na stenah jam dinarskega krasa. Gre za tenke, pogosto obsežne, mikrobne prevleke, ki preraščajo stene kraških jam, ter na karakterističen način odsevajo svetlobo, zaradi česar jih lokalni jamarji imenujejo *jamsko srebro* ali *jamsko zlato* (Pašić in sod., 2010).

1.2 CILJI IN HIPOTEZE MAGISTRSKEGA DELA

Namen magistrskega dela je bil opredeliti uspešnost strategije iskanja biološko aktivnih snovi v fozmidnih knjižnicah, ki vsebujejo vključke okoljske DNA iz sivih in rožnatih prevlek Pajsarjeve jame. Če bi se takšna strategija izkazala za uspešno, bi jo lahko v nadaljevanju uporabili za iskanje in opis biološko aktivnih snovi. Sposobnost izražanja heterolognih biološko aktivnih spojin biotehnološkega pomena v gostitelju *E. coli* je ključnega pomena za prenos v industrijo. V ta namen smo si zadali sledeče cilje:

- opredelitev vrstne sestave rožnatih prevlek na stenah kraških jam Vjetrenica (BiH) in Pajsarjeva jama (Slovenija) s pomočjo analize klonskih knjižnic gena za 16S rRNA,
- izdelava dveh metagenomskih fozmidnih knjižnic iz rožnatih in sivih mikrobnih prevlek na stenah Pajsarjeve jame,
- identifikacija klonov v fozmidnih knjižnicah, ki producirajo potencialno nove biotehnološko uporabne encime ali naravne produkte.

Biotehnološki potencial jamskih mikroorganizmov smo želeli opredeliti tudi z *in silico* analizo metagenoma »Echo Passage« (Ortiz in sod., 2013). V času izdelave magistrskega dela je bil to edini objavljen metagenom, ki izvira iz jamskega okolja. V njem so shranjena zaporedja mikrobne združbe, ki naseljuje kapnike v jami »Kartchner caverns«. Zadal si sledeče cilje:

- analiza vrstne sestave mikrobne združbe z različnimi bioinformacijskimi orodji,
- identifikacija in filogenetska uvrstitev izbranih encimov v jamskem metagenomu »Echo Passage«, ki sodelujejo v kemolito(avto)trofiji,
- identifikacija in filogenetska uvrstitev ketosintaznih in kondenzacijskih domen v biotehnološko zanimivih poliketid-sintazah in sintazah neribosomskih peptidov v jamskem metagenomu »Echo Passage«.

Glavne hipoteze, ki smo jih postavili pred pričetkom dela, so bile:

- v klonski knjižnici genov za 16S rRNA rožnatih prevlek na stenah kraških jam prevladujejo predstavniki Actinobacteria,
- mikrobne prevleke naseljujejo bakterije, ki so potencialen vir novih biotehnološko uporabnih (ekstremofilnih) encimov, kot so glikozil-hidrolaze, lipolitični encimi in proteaze,
- preiskovane jame naseljujejo bakterije, ki so potencialni vir novih naravnih produktov, kot so antibiotiki,

ter

- glavne taksonomske skupine so skupne mikrobnim prevlekam v Pajsarjevi jami, jami Vjetrenica in jamskem sistemu »Kartchner caverns«,
- energija organskih molekul, ki jo izrabljajo heterotrofni jamski mikrobi, ki naseljujejo apnenčaste kapnike jamskega sistema »Kartchner caverns«, vsaj delno izhaja iz jamskih kemolitoavtotrofov in ne le iz zunanjih (organskih) virov energije,
- jamski sistem »Kartchner caverns« naseljujejo mikroorganizmi, ki vsebujejo doslej neznane gene za sintezo poliketidov in neribosomskih peptidov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 JAMSKI MIKROORGANIZMI IN NJIHOV BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL

2.1.1 Jame kot habitat mikroorganizmov

Jame veljajo za eno od najmanj raziskanih okolij, saj ocenjujejo, da je na svetovni ravni odkritih le približno 10 % vseh jam (Lee in sod., 2012). V Sloveniji, katere skoraj polovica ozemlja je zakraselega, je registriranih že preko 10.500 jam (Komac in Urbanc, 2013; Merela in sod., 2013). Jamarska zveza Slovenije jame definira kot »naravne votline, katerih dolžina ali globina človeku prehodnih rovov je vsaj 10 metrov«. Jamska okolja preučujemo že od sedemnajstega stoletja in so dobro raziskana iz geološkega in zoološkega stališča, toda skoraj povsem neraziskana iz mikrobiološkega stališča (za pregled glej Pašić in Mulaomerović, 2014). Poleg pomanjkanja hranil in odsotnosti svetlobe so v odvisnosti od tipa kamninske podlage v jami lahko prisotni tudi ekstremni gradienti, npr. v vrednosti pH in redoks potenciala (Lee in sod., 2012). Če privzamemo, da je povprečna temperatura v slovenskih kraških jamah nižja od 15 °C, lahko jame smatramo tudi za psihofilna okolja.

Eno ključnih vprašanj za razumevanje biogeokemije jamskih ekosistemov je vprašanje izvora organskih molekul, ki predstavljajo vir energije za heterotrofne jamske mikroorganizme. Za večino jam, ki imajo povezavo s površjem velja, da so viri organskega ogljika predvsem zunanji (alohtoni). Le-ti lahko v jame vstopajo: (a) s pronicanjem površinske vode, (b) s tekočo vodo, (c) z aktivnim gibanjem in iztrebki živali, (d) z rastlinskimi koreninami ali (e) z vetrom in gravitacijo. Viri energije so lahko tudi notranji (avtohtoni); gre za jamske kemo(lito)avtotrofe, ki anorganske snovi izrabljajo kot vir energije in elektronov, kot vir ogljika pa izrabljajo anorganske oblike ogljika (Culver in Pipan, 2009). Kemolitoavtotrofni primarni producenti naj bi zagotavljali vsaj del energije za jamske heterotrofe (Culver in Pipan, 2009; Ortiz in sod., 2013). Razmerje med zunanjimi in notranjimi viri energije je med drugim odvisno od tipa in lege jame, sestave mikrobnih združb v jamah ter antropogenih dejavnikov (onesnaženje, turizem).

2.1.2 Raznolikost mikroorganizmov, ki naseljujejo jamsko srebro

Na stenah nekaterih jam dinarskega krasa in širše pogosto opazimo tenke (≤ 1 mm) specifične mikrobne prevleke rožnate, sive, bele ali rumene barve. V jamah jih najdemo tako ob vhodu v jame kot tudi v popolnoma temnih delih jame, vendar nikoli v vodi. V različnih jamah so prevleke različno razširjene; tako v jami Altamira (Španija) prevleke rastejo kot posamezne kolonije premera 2–5 mm, medtem ko v Pajsarjevi jami (Slovenija) preraščajo površine več kvadratnih metrov (Cuezva in sod., 2012; Porca in sod., 2012). Na prevlekah pogosto opazimo kapljice tekočine. Le-te na značilen način odsevajo svetlobo, zaradi česar jih jamarji žargonsko označujejo kot *jamsko srebro* ali *jamsko zlato* (Pašić in sod., 2010). Prve raziskave jamskega srebra v Sloveniji segajo v sedemdeseta leta dvajsetega stoletja. Megušar in Sket (1973) sta pokazala, da je jamsko srebro organskega izvora. V osemdesetih letih so iz mikrobnih prevlek v Planinski jami uspeli izolirati aktinobakterijo *Proactinomyces spelaeophilus* in številne heterotrofne bakterijske vrste, ki so se razlikovale od do tedaj opisanih mikrobnih vrst (Kovač, 1971; Merlak, 1975).

Prve molekularno-biološke analize jamskega srebra na podlagi izdelanih klonskih knjižnic genov za 16S rRNA iz sten Pajsarjeve jame so pokazale, da v vzorcih različno obarvanih prevlek prevladujejo bakterije iz debel *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospirae* in *Acidobacteria*, medtem ko prisotnosti arhej niso uspeli pokazati (Pašić in sod., 2010). Porca in sod. (2012) so izdelali klonske knjižnice genov za 16S rRNA iz rumenih mikrobnih prevlek v kraških jamah Pajsarjeva jama (Slovenija), jamskem sistemu Sloup-Šošůvka (Češka republika) in jama Altamira (Španija). Primerjava vrstne sestave rumenih mikrobnih prevlek iz omenjenih jam je pokazala, da v rumenih mikrobnih prevlekeh prevladujejo gamaproteobakterije in aktinobakterije. Poleg tega je bilo kar 60 % vseh zaporedij (filitipov) prisotnih v vseh treh izdelanih knjižnicah, med katerimi so prevladovala zaporedja, sorodna aktinobakterijam iz podreda *Pseudonocardinae*. Cuezva in sod. (2012) so izdelali klonsko knjižnico genov za 16S rRNA iz sivih mikrobnih prevlek iz jame Altamira (Španija). Analiza vrstne sestave je pokazala močno prevlado aktinobakterij (78 % vseh zaporedij). Analiza vrstne pestrosti »gojljivih« mikrobnih predstavnikov iz mikrobnih prevlek Pajsarjeve jame je pokazala prevlado aktinobakterij (Herzog Velikonja in sod., 2014). Tako se zdi, da so aktinobakterije splošno razširjene v jamskem srebru in imajo v jamah tudi pomembno biogeokemično vlogo, saj aktivno sodelujejo v speleogenezi (Cuezva in sod., 2012).

2.1.3 Encimi in naravni produkti biotehnološkega pomena

Encimi kot biokatalizatorji imajo številne prednosti pred kemičnimi katalizatorji: (a) so bolj specifični (kemo-, regio-, diastereo- in/ali enantioselektivnost), (b) so bolj učinkoviti, (c) imajo možnost ponovne uporabe in imobilizacije, (d) so biorazgradljivi in (e) lahko jih proizvedemo v neomejenih količinah (Faber, 2011). Leta 2010 so vrednost tehničnih encimov na globalnem trgu ocenili na pribl. 1 milijardo ameriških dolarjev. Med njimi s 75% prevladujejo hidrolaze, predvsem glikozil-hidrolaze, proteaze in lipaze. Potreba po novih encimih narašča, saj le malo encimov izkazuje visoko aktivnost pri razmerah, pri katerih proces poteka, kot tudi kemo- in enantioselektivnost (López-López in sod., 2014). Zato ne preseneča, da se raziskave vedno bolj usmerjajo v odkrivanje novih encimov iz ekstremofilnih mikroorganizmov oz. izboljšavo že znanih encimov (Li in sod., 2012).

Amilaze so glikozil-hidrolaze, ki cepijo glikozidne vezi v škrobu, pri čemer nastajajo dekstrini in oligosaharidi. Delimo jih na tri skupine: (a) α -amilaze (EC 3.2.1.1), (b) β -amilaze (EC 3.2.1.2) in (c) γ -amilaze (EC 3.2.1.3). Amilaze najdemo pri živalih, rastlinah in mikroorganizmih. Glive in bakterije veljajo za najpomembnejše vire industrijsko uporabnih amilaz. V živilski industriji se uporabljajo npr. v pivovarstvu, kjer zmanjšujejo viskoznost piva in povečajo vsebnost glukoze in fruktoze. Uporabljajo se kot dodatek krmi za povečanje njene prebavljivosti, pri pridobivanju fruktoznega in glukoznega sirupa, kristalinične glukoze, maltoze ter maltodekstrina (Li in sod., 2012; Sundarram in Murthy, 2014).

Celulaze so glikozil-hidrolaze, ki razgrajujejo celulozo. Delimo jih na endo-(1,4)- β -glukanaze (EC 3.2.1.4), celobiohidrolaze (EC 3.2.1.91) in β -glukozidaze (EC 3.2.1.21) (Sørensen in sod., 2013).

Endoglukanaze naključno hidrolizirajo notranje beta-(1,4)-glikozidne vezi v celuloznem polimeru in tako povečujejo dostopnost polimera za razgradnjo s celobiohidrolazami. Viri endoglukanaz so nitaste glive, pa tudi drugi mikroorganizmi, rastline in živali (členonožci in gliste). Uporabne so v proizvodnji bioetanol, v tekstilni industriji (povečanje mehko-be tekstila in videz iznošenosti kavbojk), kot dodatek krmi, v živilski industriji, papirni industriji (npr. za izboljšanje lastnosti lesovine) in industriji detergentov (npr. ohranjanje barve in prepečitev muckanja tekstila) (Amore in sod., 2013; Bhat, 2000).

β-glukozidaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo alkilnih ali arilnih β-glikozidov, disaharidov in kratkoverižnih oligosaharidov. Nekateri β-glukozidaze katalizirajo tudi sintezne reakcije – transglikozilacijo ali reverzno hidrolizo. Viri β-glukozidaz so mikroorganizmi, rastline in živali. Hidrolitično aktivnost β-glukozidaz izrabljamo tudi v živilski industriji (npr. za izboljšanje arome vina) in kot dodatek krmi za njeno boljšo prebavljivost. Sintezna aktivnost β-glukozidaz je uporabna za sintezo alkil-glikozidov in oligosaharidov, ki so uporabni v živilski, farmacevtski, kozmetični, kemični industriji in industriji detergentov (Krisch in sod., 2010).

Hitinaze so glikozil-hidrolaze, ki cepijo β-(1,4)-glikozidne vezi v hitinu. Delimo jih na: (a) endohitinaze (EC 3.2.1.14), ki cepijo notranje vezi v hitinu, pri čemer se sproščajo diacetilhitobioza in topni oligomeri N-acetilglukozamina (GlcNAc), in (b) eksohitinaze. Slednje delimo na (a) hitobiozidaze (EC 3.2.1.29), ki zaporedno odcepljajo diacetilhitobiozne enote iz nereducirajočega konca polimera, in (b) (1,4)-β-glukozaminidaze (EC 3.2.1.30), ki cepijo hitooligomere v monomerne enote GlcNAc (Hamid in sod., 2013). Hitinaze najdemo pri virusih, mikroorganizmih, rastlinah in živalih. Uporabljamo jih za zatiranje fitopatogenov, kot prezervativ semen in za nadzor populacije komarjev, kot prezervativ za podaljšanje roka uporabnosti živil, za pripravo glivnih protoplastov, preučevanje sinteze in izločanja encimov in izboljšanje sevov za biotehnološke aplikacije. Z njimi odstranjujemo s hitinom bogate odpadke, npr. pri pridelavi »morskih sadežev«. Hitinaze se uporabljajo za pridobivanje hitooligosaharidov, glukozamina in GlcNAc, ki delujejo protibakterijsko, protiglivno, protivirusno, protivnetno, protirakavo, antiangiogeno, antioksidativno, nevroprotektivno in imunostimulativno. Nekateri hitooligosaharidi so elicitorji, ki inducirajo rastlinski prirojen obrambni sistem, kar bi lahko uporabili za indukcijo obrambe rastlin pred fitopatogeni (Bhattacharya in sod., 2007; Hamid in sod., 2013; Lodhi in sod., 2014).

Ksilanaze delimo na: (a) endoksilanaze (endo-(1,4)-β-ksilanaze, EC 3.2.1.8), ki cepijo notranje β-(1,4)-ksilopiranozne vezi, pri čemer se sproščajo ksiloooligomeri, in (b) β-ksilozidaze (ksilan-(1,4)-β-ksilozidaze, EC 3.2.1.37), ki cepijo ksiloooligomere v ksilozne enote (Juturu in Wu, 2012). Viri ksilanaz so mikroorganizmi, živali in rastline. Uporabne so za beljenje lesovine in papirne kaše. Uporabljamo jih npr. pri peki kruha, zbistrenju sokov ter utekočinjenju sadja in zelenjave. Uporabljajo se kot dodatek krmi za povečanje njene prebavljivosti in hranilne vrednosti. Uporabne so pri proizvodnji biogoriv iz lignoceluloznih substratov. Ksilanaze lahko uporabimo v procesu pridobivanja ksilitola. V industriji detergentov se uporabljajo za odstranjevanje rastlinskih madežev (Amore in sod., 2013; Juturu in Wu, 2012).

Proteaze delimo na: aspartatne, cisteinske, glutamatne, serinske, treoninske proteaze in metaloproteaze. Glede na mesto delovanja znotraj substrata ločimo ekso- in endopeptidaze. Slednje delimo na (a) aminopeptidaze, ki odcepljajo posamezne aminokisline (EC 3.4.11), dipeptide (EC 3.4.14) ali tripeptide (EC 3.4.14) iz N-konca substrata, in (b) karboksipeptidaze, ki odcepljajo posamezne aminokisline (EC 3.4.16–3.4.18) ali dipeptide (EC 3.4.15) iz C-konca substrata. Dipeptidaze (EC 3.4.13) cepijo dipeptide v dve aminokislinski enoti (Mótyán in sod., 2013; Li in sod., 2013). Proteaze uporabljamo v usnjarstvu za odstranjevanje dlak, v industriji detergentov, v sirarstvu, v mesni industriji, v proizvodnji piva, v kozmetični industriji in kot dodatek krmi. Nekatere proteaze so biološka zdravila, ki se uporabljajo za čiščenje ran (kolagenaza), zdravljenje trombolize (urokinaza), hemofilije (faktor VIIa), sepse (aktiviran protein C) in mišičnih krčev (toksina botulinum A in B). Prav tako se proteaze pogosto uporabljajo v raziskovanju in diagnostiki, predvsem na področju molekularne biologije (Mótyán in sod., 2013; Li in sod., 2012; Li in sod., 2013).

Glavni skupini **lipolitičnih encimov** sta: (a) esteraze (karboksilesteraze, EC 3.1.1.1), ki hidrolizirajo kratkoverižne ($C < 12$) karboksilne kisline, in (b) »prave« lipaze (triacilglicerol-lipaze, EC 3.1.1.3), ki hidrolizirajo nevodotopne dolgoverižne ($C \geq 12$) trigliceride. Za razliko od esteraz lipaze delujejo na interfazi voda–lipid (interfazna aktivacija) (López-López in sod., 2014). Viri lipolitičnih encimov so mikroorganizmi, virusi, živali in rastline. Uporabljamo jih za zatiranje škodljivcev, za odstranitev lesnega katrana iz papirne kaše, za sintezo biopolimerov in optično čistih spojin, za razgradnjo alifatskih poliestrov in izrabljenega kuhinjskega olja. Z njimi pridobivamo večkrat nenasičene maščobne kisline, ki so pomembni nutricevtiki in farmacevtiki. Uporabljamo jih tudi za razvoj biosenzorjev, ki so uporabni v diagnostiki, živilski industriji in na področju okoljskega monitoringa. Fosfolipaze so uporabne npr. za odstranjevanje fosfolipidov iz rastlinskega olja, pri modifikaciji lecitina in pri proizvodnji majoneze. Lipolitični encimi se uporabljajo tudi v industriji detergentov, proizvodnji biodizla in v kozmetični industriji (Hoshino in sod., 2002; Kumar in sod., 2012; Ray, 2012; Shah in sod., 2014).

Poliketidi so bioaktivne snovi, ki vsebujejo številne β -hidroksiketonske ali β -hidroksialdehidne funkcijske skupine. Predstavljajo strukturno ogrodje številnih spojin z antiholesteremičnim, protirakavim, parazitocidnim, imunomodulatornim in antibiotičnim delovanjem. Letna prodaja tovrstnih farmacevtikov presega 20 milijard ameriških dolarjev (Weissman, 2009). Proizvajajo jih bakterije in glive, nekatere rastline, protisti, strunarji in kolobarniki (Parsley in sod., 2011; Wang in sod., 2014). Poliketid-sintaze (PKS) delimo na tri glavne skupine. PKS tipa I so veliki večfunkcijski encimi z modularno organizacijo, ki imajo eno ali več ketosintaznih (KS) domen na enem polipeptidu. Delujejo lahko iterativno ali neiterativno. PKS tipa II so večencimski kompleksi, pri katerih je vsaka od domen lasten protein. Domene delujejo iterativno. PKS tipa III, znane tudi kot halkon-sintaze, so homodimerni encimi, ki delujejo iterativno. PKS tipa III so za razliko od PKS tipa I in II neodvisne od acil-prenašalnega proteina (ACP) in neposredno vgrajujejo monomere acil-CoA v nastajajoči polimer. Znanе so tudi PKS, ki po strukturi in/ali mehanizmu delovanja odstopajo od omenjene paradigmatične delitve (Anand in Mohanty, 2013; Shen, 2003; Wang in sod., 2014).

Neribosomski peptidi imajo pogosto biološke aktivnosti, kot so protibakterijska, protiglivna, protivirusna, imunosupresivna ali protirakava aktivnost. Medicinsko pomembni so predvsem β -laktami, daptomicin, ciklosporin A, glikopeptidi, kinoksalini, kapreomicin in bleomicini (Felnagle in sod., 2007). Najpomembnejši viri neribosomskih peptidov so bakterije in glive, najdemo pa jih tudi pri nekaterih algah, arhejah in kotačnikih (Wang in sod., 2014). Sintaze neribosomskih peptidov (NRPS) so običajno modularni večdomenski encimi in kažejo strukturno podobnost s PKS tipa I. Znani so tudi primeri nemodularnih NRPS, kjer so posamezne domene ločeni proteini – tovrstne NRPS so tako po strukturi podobnejše PKS tipa II (Wang in sod., 2014).

Hibridni produkti poliketid–neribosomski peptid so produkti hibridnih sintaz neribosomskih peptidov–poliketid-sintaz (NRPS–PKS). Medicinskega pomena so rapamicin (protiglivna in protirakava aktivnost), bleomicin (protirakava in protivirusna aktivnost) in epotiloni (protirakava aktivnost) (Felnagle in sod., 2007). Najpomembnejši viri hibridnih poliketidov–neribosomskih peptidov so bakterije in glive, najdemo pa jih tudi pri nekaterih protistih, mehkužcih, žuželkah in glistah (Wang in sod., 2014).

2.1.4 Biotehnološki potencial jamskih mikroorganizmov

Iz biotehnološkega vidika so jame zanimiv habitat, saj so v njih opisali številne aktinobakterijske vrste (Priloga A). Aktinobakterije veljajo za glavne producente naravnih produktov mikrobnega izvora (Bérdy, 2005). Tomova in sod. (2012) so iz kraške jame Magura (Bolgarija) izolirali 46 heterotrofnih bakterij, med katerimi so prevladovali proteobakterije. Opredelili so njihov potencial za produkcijo biotehnološko zanimivih hidrolaz ter hemolitično in protimikrobno aktivnost. Frekvenca hidrolitične aktivnosti se je gibala od 21 % (fitaze) do 87 % (proteaze). Poleg tega je več kot 75 % izolatov izkazovalo protimikrobno in hemolitično aktivnost. Cheeptham in sod. (2013) so iz vulkanske jame »Helmcken Falls« (Kanada) izolirali 400 bakterijskih izolatov in jih presejalno testirali za protimikrobno aktivnost proti osmim različnim bakterijskim sevom in kvasovki *S. cerevisiae*. Večina izolatov je pripadala rodu *Streptomyces*, 12 od 86 analiziranih zaporedij pa se ni uvrščalo v nobeno že opisano bakterijsko vrsto. Številni izolati so imeli protimikrobno aktivnost. Frekvenca antibiotične aktivnosti se je gibala od 1,0 % (*E. coli* ESBL) do 26,5 % (*Klebsiella pneumoniae*). Tudi *Nonomuraea monospora*, aktinomyceta, ki so jo opisali v tleh tajskega jamskega sistema »Pha Tup Cave Forest Park«, proizvaja snovi s protimikrobno in protirakavo aktivnostjo (Sungthong in Nakaew, 2014).

2.2 METAGENOMIKA

Z izrazom *metagenomika* opisujemo pristope, ki omogočajo neposredno analizo zaporedij DNA v okoljskem vzorcu (Thomas in sod., 2012). Danes v metagenomiki opazamo dva glavna pristopa: (a) naključno sekvenciranje (ang. *shotgun sequencing*) in (b) sekvenciranje črtnih kod DNA (ang. *barcode sequencing*). Pri prvem pristopu z novimi tehnologijami sekvenciranja (npr. Illumina/Solexa) določimo zaporedja obsežnega deleža celotne okoljske DNA. Tako nastala kratka zaporedja, ki jih imenujemo tudi odčitki (ang. *reads*), lahko sestavimo (ang. *assembly*) v daljša zaporedja, imenovana soseske (ang. *contigs*), in jih anotiramo. Z nadaljnjo bioinformacijsko analizo zaporedij dobimo vpogled v funkcijski potencial združbe in zastopanost posameznih skupin genov (Culligan in sod.,

2014). Pri drugem gre za tarčno sekvenciranje izbranega gena, največkrat za filogenetski opis sestave in strukture mikrobnih združb z geni za 16S rRNA oz. 18S rRNA ter gospodinjskimi geni.

Poleg zgoraj omenjenih pristopov, ki temeljijo na zaporedjih, se v metagenomiki poslužujemo tudi funkcijsko-metagenomskega pristopa. Slednji vključuje izdelavo klonskih knjižnic, ki vsebujejo daljše odseke (≥ 25 kb) okoljske DNA. Te fragmente skušamo izraziti v izbranem mikrobnem gostitelju (najenostavneje *E. coli*). Tako pripravljeno metagenomsko knjižnico pregledujemo s presejalnimi testi in določimo ter analiziramo le nukleotidno zaporedje vključkov klonov, ki nas zanimajo. Prednost tovrstnega pristopa, ki smo ga uporabili tudi v tem delu, je vpogled v daljše odseke genomov mikroorganizmov. Pomanjkljivosti tega pristopa so predstavljene v nadaljevanju tega dela.

Metagenomika je zelo vplivala na napredek na področju mikrobne ekologije (Thomas in sod., 2012; Culligan in sod., 2014). Že analiza metagenoma Sargaškega morja, enega prvih opisanih, je vodila k pomembnemu odkritju – odkritju bakterijskega proteorodopsina (Béjà in sod., 2001). Raziskave metagenomov so postale nepogrešljive v biotehnologiji (Culligan in sod., 2014), saj so pripeljale do opisa številnih bioaktivnih snovi biotehnološkega pomena, kot je povzeto v Preglednici 1.

Preglednica 1: Primeri uporabnosti metagenomike na številnih področjih aktivnosti v biotehnologiji (povzeto po DaSilva, 2004).

Delitev BTH glede na barvo	Področje aktivnosti	Primer uporabe metagenomike na dotičnem področju	Vir
bela BTH	industrijska BTH, ki temelji na genih	izolacija novih lipolitičnih encimov iz mikrobioma vampa	Privé in sod., 2015
modra BTH	morska, obalna BTH, BTH akvakultur	oceani kot vir mikrobov, ki so producenti novih naravnih produktov	Barone in sod., 2014
rdeča BTH	medicina, zdravje, diagnostika	zgodnje odkrivanje kolorektalnega raka na podlagi vrstne sestave fekalne mikrobiote	Zeller in sod., 2014
rjava BTH	BTH sušnih območij, puščav	izolacija nove psihrofilne kisle endocelulaze iz hladne puščave Ladakh	Bhat in sod., 2013
rožnata BTH	patenti, izumi in objave	patentiranje metagenomske alkalne fosfataze	Lee in sod., 2014 (št. patenta US 8,647,854 B2)
rumena BTH	živilska BTH, nutricionistika	uporaba alfa-amilaz v živilski industriji za utekočinjenje škroba	Sathya in Khan, 2014
siva BTH	klasične fermentacije, bioprocenstvo	uporaba celulaz za izboljšano pripravo slada pri proizvodnji piva	Sathya in Khan, 2014

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 1: Primeri uporabnosti metagenomike na številnih področjih aktivnosti v biotehnologiji (povzeto po DaSilva, 2004).

Delitev BTH glede na barvo	Področje aktivnosti	Primer uporabe metagenomike na dotičnem področju	Vir
temna BTH	bioterorizem, biološka orožja, biozločini	odkrivanje novih človeških virusov	Tang in Chiu, 2010
zelená BTH	okoljevarstvena BTH, kmetijstvo (biogoriva, biognojila, geomikrobiologija, bioremediacija)	hitinaza kot bionadzorni agens za fitopatogene	Hjort in sod., 2014
zlata BTH	bioinformatika, nanobiotehnologija	številna bioinformacijska orodja za analizo metagenomskih podatkov	Kim in sod., 2013

BTH, biotehnologija. Področja delovanja v BTH se velikokrat prekrivajo.

2.2.1 Izolacija metagenomske DNA

Izolacijo kvalitetne metagenomske DNA dosežemo tako, da najdemo kompromis med sledečimi kriteriji: (a) čim višja čistost izolirane DNA, (b) čim višja koncentracija izolirane DNA, (c) čim bolj uspešna in nepristranska liza celic v vzorcu, (d) primerna fragmentiranost okoljske DNA ter (e) čim manj tehnično zahtevna in časovno čim manj zamudna izvedba metode izolacije (Fatima in sod., 2014).

Ločimo dva pristopa k lizi celic ob izolaciji DNA iz okoljskih vzorcev: (a) neposredna liza brez predhodne ločitve od preostalega vzorca, in (b) posredna liza celic, pri kateri celice najprej ločimo od preostalega vzorca. V splošnem velja, da pri neposredni izolaciji DNA navadno dobimo večje količine bolj fragmentirane DNA, medtem ko pri posredni izolaciji dobimo DNA manjše koncentracije, vendar večje velikosti in čistosti (Delmont in sod., 2011).

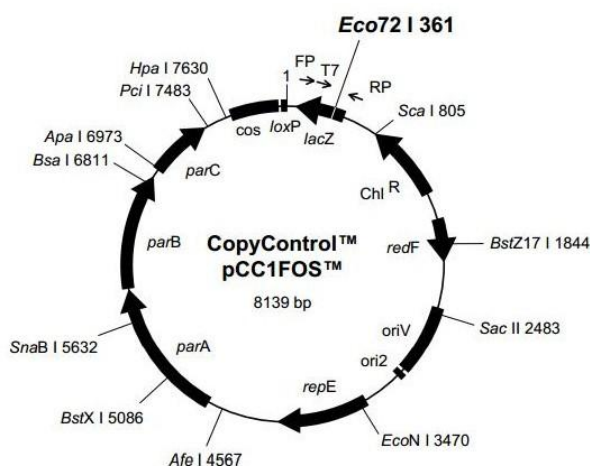
2.2.2 Fozmidi kot vektorji za izdelavo metagenomskih knjižnic

Fozmid je vektor, katerega mesto *ori* (na Sliki 1 označeno kot *ori2*) in particijski sistem izhajata iz plazmida F-faktor. V celici so prisotni le v eni kopiji. Podvojevanje fozmida omejuje mesto *ori2* (ali *oriV*) (Lam in Charles, 2015; Godiska in sod., 2005). Fozmid ne vsebuje močnega promotorja ob poliklonskem mestu, ker bi prekomerno izražanje genov na vključku lahko bilo za celico toksično. Nekateri vključki so bistveno bolj stabilni v fozmidnih kot v drugih vektorjih. Tovrstni fragmenti imajo pogosto (a) visoko vsebnost (> 70 %) baznih parov adenin–timin (AT), (b) močno sekundarno strukturo, (c) *cis*-delujoče regulatorne elemente, (d) dvo- in trinukleotidne tandemske ponovitve in/ali (e) gene, katerih produkti so za celico toksični (Godiska in sod., 2005).

Kot vsi vektorji imajo tudi fozmidi pomanjkljivosti. Proporcionalno manjšo zastopanost zaporedij, bogatih z baznimi pari AT, pripisujejo njihovi manjši odpornosti proti nepravokotnim strižnim silam (Temperton in sod., 2009) oziroma transkripcijski aktivnosti in toksičnosti produktov genov v vključkih (Lam in Charles, 2015). Izražanje genov v vključku lahko preko mehanizmov transkripcijske interference negativno vpliva na

izražanje dominantnega selekcijskega označevalca ali genov, vpletenih v podvojevanje fozmida. Posledično lahko pride do nastanka pristranske knjižnice (Lucigen Corporation, 2015). Če vključek vsebuje promotor, ki vodi v izražanje gena *lacZ* v fozmidnem vektorju, to lahko privede do navidezno nerekombinantnih kolonij pri selekciji z α -komplementacijo (Godiska in sod., 2005).

V nalogi smo uporabili vektor pCC1FOS (Epicentre), ki je velik 8.139 bp, in ima kot selekcijski označevalec gen za odpornost proti kloramfenikolu (Cm^R) (Slika 1). Vektor se linearizira z restrikcijsko endonukleazo *Eco72I*. Mesto *cos* fozmidu omogoča pakiranje DNA v glavo faga λ . Podvojevanje pCC1FOS lahko induciramo (Culligan in sod., 2014; Epicentre, 2012a). Fozmid pCC1FOS okoli poliklonskega mesta nima terminatorjev transkripcije. Le-ti so pomembni, ker preprečijo (a) transkripcijsko interferenco med vektorjem in vključkom, (b) prepis genov v vektorju s promotorji v vključku in (c) prepis genov v vključku s promotorji v vektorju (Godiska in sod., 2005).



Slika 1: Restriksijska karta fozmidnega vektorja pCC1FOS (karta ne prikazuje vseh prepoznavnih mest za restrikcijske endonukleaze z enim prepoznavnim mestom) (Epicentre, 2012a)

2.2.3 Prednosti in pomanjkljivosti *E. coli* kot gostitelja

Fozmidne vektorje običajno vnašamo v *E. coli*, ki jo odlikujejo (a) delna promiskuitetnost pri prepoznavanju signalov za heterologno izražanje genov, (b) odsotnost restrikcijsko-modifikacijskega sistema in z RecA posredovane homologne rekombinacije ter (c) sposobnost prevajanja genske informacije mRNA, ki ima različne translacijske signale, saj je iniciacija translacije neodvisna od komplementarnosti zaporedja Shine-Dalgarno v mRNA z zaporedjem v 3'-koncu 16S rRNA (Culligan in sod., 2014).

Pomanjkljivosti *E. coli* so (a) razlike v prepoznavi različnih *cis*-delujočih regulatornih elementov in (b) odsotnost dejavnikov, kot so molekularni spremljevalci, posebni transkripcijski faktorji, kompatibilen sistem izločanja iz celice, induktorji, kofaktorji in modifikacijski encimi (Culligan in sod., 2014; Gabor in sod., 2004). Nadalje se produkt v celici lahko pospešeno razgradi, tvori inkluzijska telesca, koagregira z drugimi proteini gostitelja ali deluje toksično. Izražanje tujih genov omejuje pristranskost rabe kodonov in preferenčna raba različnih start kodonov (Ekkers in sod., 2012). Posledično so na podlagi

bioinformacijske analize ekspresijskih signalov ocenili, da *E. coli* izraža le okoli 40 % heterolognih genov (Gabor in sod., 2004).

Obstajajo številne strategije povečanja uspešnosti izražanja heterolognih genov v *E. coli*. Primer je inženiring njenega transkripcijsko-translacijskega sistema. Poleg tega se številni avtorji posvečajo razvoju prenosljivih vektorjev in uporabi alternativnih gostiteljev z namenom povečanja uspešnosti identifikacije novih biotehnološko zanimivih bioaktivnih snovi (Uchiyama in Miyazaki, 2011).

2.2.4 Opredelitev kvalitete metagenomske knjižnice

Pomemben prvi korak v analizi metagenomskih knjižnic je opredelitev kvalitete pripravljene knjižnice, saj želimo pri pripravi zagotoviti, da so v knjižnici prisotna vsa zaporedja preiskovane DNA. Najprej opredelimo napor pregledovanja, ki ga razumemo kot minimalno potrebno število klonov, ki jih moramo pregledati v genomske knjižnici (N), da z določeno verjetnostjo trdimo, da je pri vsaj enem od klonov prisotno intaktno preiskovano zaporedje. Število klonov izračunamo po enačbi (1):

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)} \quad \dots(1),$$

kjer N predstavlja minimalno število klonov, ki jih je potrebno pregledati, P predstavlja verjetnost, da je preiskovano intaktno zaporedje prisotno pri vsaj enem izmed vseh pregledanih klonov, f je delež velikosti celotnega genoma, ki ga predstavlja vključek (f = dolžina vključka/velikost genoma) (Kim in sod., 2008).

Enačba (1) velja le v primeru, ko je dolžina iskanega zaporedja zanemarljivo majhna v primerjavi z velikostjo celotnega vključka. V primeru iskanja dolgih nukleotidnih zaporedij (npr. celotnih biosinteznih poti), je potrebno enačbo (1) popraviti s koeficientom c , ki določa verjetnost, da vključek vsebuje intaktno preiskovano zaporedje:

$$c = \frac{I - B + 1}{I} \quad \dots(2),$$

kjer je B dolžina preiskovanega zaporedja, I je dolžina vključka. Tako dobimo s koeficientom c popravljeno enačbo (1) (Kim in sod., 2008):

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - (c \times f))} \quad \dots(3).$$

Poudariti velja, da ima tudi enačba (3) nekatere pomanjkljivosti, saj npr. ne zajema (a) različne zastopanosti mikroorganizmov v danem okolju in (b) različnega števila kopij preiskovanega gena na genom. Gre za privzete pomanjkljivosti metagenomskih raziskav, ki se jim ni moč izogniti.

2.2.5 Presejalni testi metagenomskih knjižnic za preiskovane lastnosti

Presejalni testi temeljijo na zaporedjih gena ali na njegovi funkciji. Teste, ki temeljijo na zaporedjih, lahko izvajamo na dva načina. Pri prvem zaporedja, ki so sorodna iskanim, uporabimo kot sondo pri hibridizaciji točkovno nanosenih vzorcev (Quail in sod., 2011). Pri drugem pristopu na osnovi zaporedij, sorodnih iskanem, pripravimo degenerirane začetne oligonukleotide za PCR (Rose in sod., 1998). Ob tem kot matrično DNA uporabimo DNA večjega števila vektorjev z vključkom. V primeru, da je PCR na takšno združeno matrično DNA (ang. *pooled* PCR) pozitiven, reakcijo ponavljamo na vedno manjšem naboru različnih vektorjev z vključki, dokler ne opredelimo pozitivnega klon (npr. Kim in sod., 2003). Pomanjkljivosti so, da smo omejeni na iskanje zaporedij, ki so sorodna že znanim zaporedjem ter lastnostim PCR, da bolj učinkovito pomnožuje bolj zastopane gene (Culligan in sod., 2014).

Funkcijski presejalni testi temeljijo na zaznavi (detekciji) aktivnosti preiskovanega gena, ki je navadno encim ali naravni produkt. Prednost funkcijske metagenomike je, da ni omejena z raznolikostjo že znanih različic preiskovane družine genov, marveč lahko vodi v odkritje genov s povsem novimi lastnostmi in/ali aktivnostmi (Culligan in sod., 2014).

2.2.6 Pomanjkljivosti presejalnih metod, ki temeljijo na indikatorskih gojiščih

Metagenomske knjižnice pogosto presejalno pregledujemo na trdnih ali v tekočih indikatorskih gojiščih, s pomočjo katerih spremljamo preiskovano aktivnost. Kljub temu da so tovrstna gojišča navadno poceni in enostavna za uporabo ter imajo možnost avtomatizacije, imajo številne pomanjkljivosti. V določenih primerih aktivnosti enostavno ne moremo slediti s presejalnimi testi, ki temeljijo na indikatorskih gojiščih. Tako je sledenje neuspešno, če obstaja:

- odsotnost ali nekompatibilost sistema izločanja preiskovane bioaktivne snovi pri gostiteljskem sevu,
- potreba po izločanju zadostne količine bioaktivne snovi za zaznavo aktivnosti (problem občutljivosti oz. praga zaznave testa),
- toksično delovanje preiskovane bioaktivne snovi na celico,
- pospešena razgradnja preiskovane bioaktivne snovi v celici (Ekkers in sod., 2012).

Tudi presejalni testi za protimikrobno aktivnost, ki temeljijo na prelivanju klonov z mehkim agarjem, v katerega vmešamo indikatorski sev, imajo nekatere pomanjkljivosti. Ključnega pomena za zaznavo klonov s protimikrobno aktivnostjo je pravilna izbira indikatorskega seva. Uporaba *E. coli* kot indikatorskega seva se zdi smiselna zaradi naraščajoče potrebe po odkritju antibiotikov, ki delujejo proti večkratno odpornim gramnegativnim vrstam (Bassetti in sod., 2011). Baltz (2007) pri testiranju protimikrobne aktivnosti okoljskih aktinomicetnih izolatov svetuje uporabo indikatorskega seva *E. coli*, ki je odporen proti številnim standardnim antibiotikom, kar zmanjša ponovno odkrivanje protibakterijskih učinkovin z že znanimi mehanizmi delovanja. *B. subtilis* je bakterija, ki se najpogosteje uporablja kot indikatorski organizem za primarno presejalno testiranje klonov s protibakterijsko aktivnostjo v metagenomskih knjižnicah (npr. Rondon in sod., 2000; Craig in sod., 2010). V primeru uporabe *S. cerevisiae* kot indikatorskega organizma so Corran in sod. (1998) pokazali, da je 67 % testiranih fungicidov vodilo v inhibicijo rasti v

območju koncentracije 5–100 µg/ml, in tako predlagali uporabo *S. cerevisiae* kot indikatorskega organizma za iskanje kandidatnih fungicidov.

K učinkovitosti presejalnih testov prispevajo tudi razmere gojenja preiskovanih mikroorganizmov. Tako so denimo opazili, da se v določenih primerih genski zapisi za sintezo antibiotikov izražajo le v tekočem, ne pa tudi na trdnem gojišču, ali obratno (Rodríguez-Sáiz in sod., 2005). Znano je tudi, da na sintezo antibiotika vplivajo sestava gojišča (koncentracija hranil in vrednost pH), razmere v okolju (npr. temperatura) in čas inkubacije (Amin in sod., 2002). Pomembna dejavnika sta tudi koncentracija in faza rasti indikatorskega seva, ki ga vmešamo v mehki agar. Za primerljive rezultate moramo indikatorski sev vmešati v mehki agar vedno v isti koncentraciji in fazi rasti (navadno eksponencialna faza rasti), poskrbeti za enako debelino izhodnih plošč ter zagotoviti, da je prerast trdnih gojišč zadostna, da opazimo morebitne cone inhibicije. Zato je smiselno navedene korake najprej optimizirati, nato pa avtomatizirati in tako zmanjšati variabilnost testov, ki je posledica človeškega faktorja.

2.2.7 Pomanjkljivosti iskanja novih neribosomskih peptidov in poliketidov s pristopom funkcijske metagenomike

Spričo naraščajoče potrebe po novih antibiotikih je iskanje protimikrobnih učinkovin s funkcijsko metagenomiko izjemnega pomena. Četudi je tak pristop privlačen, najpogosteje vodi v identifikacijo naravnih produktov s protimikrobnim delovanjem, ki niso poliketidi ali neribosomski peptidi, kot so npr. indirubin, turbomicin A in B, N-acilne aminokisline, palmitoilputrescin in izocianid (Nováková in Farkašovský, 2013). Za to obstaja več razlogov. Gruče genov NRPS/PKS so običajno velike 15–120 kbp (Soares Gomes in sod., 2013) in jih redko v celoti zajamemo v vključku fozmidnega klona. Poleg tega so v njih običajno prisotni avto-odpornostni geni in regulatorni geni (Martin, 1992). Bakterije lahko regulatorne gene uravnavajo z lastnimi produkti, produkti drugih gruč genov PKS/NRPS ali majhnimi regulatornimi molekulami, kot so γ -butirolaktoni (Liu in sod., 2013). Posledično je izražanje gruč pogosto utišano že v naravnem gostitelju. Metagenomika tako lahko predstavlja le izhodišče za odkrivanje potencialnih novih naravnih produktov, ki jim sledi optimizacija izražanja genskih gruč NRPS/PKS.

Na podlagi *in silico* analize ekspresijskih signalov so ocenili, da je *E. coli* sposobna izražanja le 7 % vseh aktinobakterijskih genov (Gabor in sod., 2004). K nezmožnosti sinteze v heterolognem gostitelju pogosto prispevajo prenizka koncentracija ali odsotnost specifičnih gradnikov, potrebnih za njihovo sintezo – npr. odsotnost metilmalonil-CoA pri *E. coli* in odsotnost kompatibilne fosfopantetein-transferaze (PPTaze) za aktivacijo tiolacijskih domen v heterologni NRPS/PKS (Xie in sod., 2012). Poleg tega velja, da je cona inhibicije na indikatorskih gojiščih pogosto šibka, zato lahko spregledamo morebitne pozitivne klone (Brady, 2007).

Charlop-Powers in sod. (2013) so razvili zanimivo izboljšavo za iskanje PKS/NRPS pozitivnih klonov s pristopom funkcijske metagenomike. Kot gostiteljski sev za izdelavo kozmidne knjižnice so uporabili bakterijo *E. coli* z izbranim genom za PPTazo, ki v odsotnosti PPTaze ni sposobna sinteze sideroforja (sekundarnega metabolita) enterobaktina. Ob komplementaciji, ki je odvisna od PPTaze iz okoljske DNA, so na

seleksijskem gojišču z nizko vsebnostjo železa zrasli le PPTaza pozitivni kloni. Ker so geni za PPTazo pogosto prisotni v gručah genov PKS/NRPS, saj PPTaza aktivira tiolacijske domene v NRPS/ PKS, so avtorji na ta način dosegli skoraj 50-kratni porast v številu NRPS/PKS pozitivnih klonov v primerjavi z neobogateno knjižnico.

Problem heterolognega izražanja nekaterih heterolognih gruč genov PKS v *E. coli* je odsotnost metilmalonil-CoA. Yuzawa in sod. (2012) so težavo premostili z vnosom genov iz termofilnih krenarhej, katerih produkti so udeleženi v 3-hidroksipropionat/ 4-hidroksibutiratni (HP/HB) poti fiksacije CO₂. Rekombinantni sev je tako sintetiziral propionil-CoA iz malonil-CoA, ki ga je nadalje pretvoril v metilmalonil-CoA in bil tako primeren za sintezo heterolognih poliketidov iz obnovljivih virov ogljika.

2.3 BIOINFORMACIJSKA ANALIZA METAGENOMSKIH ZAPOREDIJ

Nukleotidna zaporedja vključkov klonskih knjižnic in celotnih metagenomov običajno določajo v komercialnih podjetjih. Kvaliteta zaporedij je odvisna od kvalitete in čistosti izolirane DNA kot tudi od izbrane tehnologije sekvenciranja. Ključen korak pri analizi metagenomskih zaporedij je njihova razvrstitev v taksonomske skupine (ang. *binning*) (Slika 2).



Slika 2: Strategije taksonomskega pripisa metagenomskim zaporedjem (povzeto po Bazinet in Cummings, 2012)

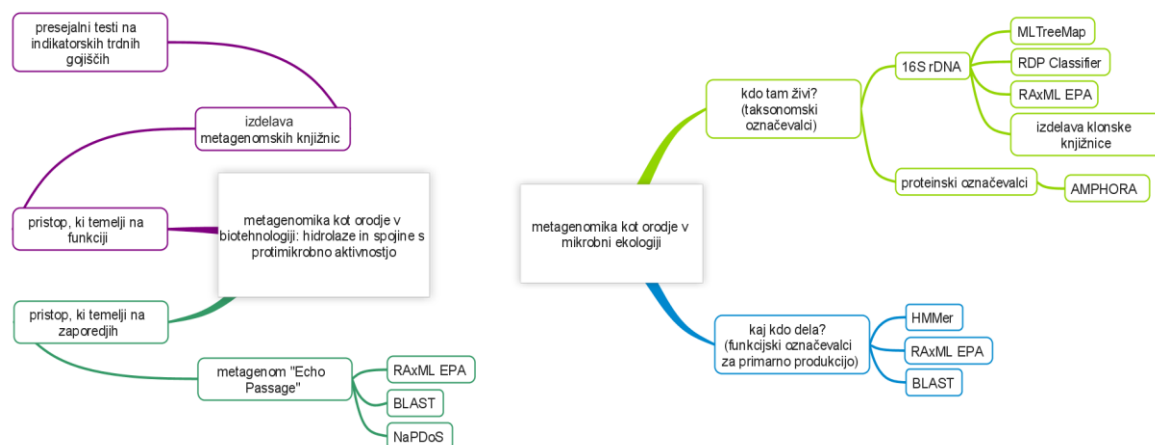
Razvrščanje zaporedij glede na podobnost izvajamo z (a) algoritmom BLAST, ki temelji na poravnavi zaporedij, ali (b) s profili skritih modelov Markova (ang. *Hidden Markov profiles*) (Torres-Estupiñan in Barreto-Hernández, 2012). Pri delu smo uporabili dve orodji. **IMG/M** (*The integrated microbial genomes and metagenomes database and comparative analysis system*; dostopno na <http://img.jgi.doe.gov/m>) je spletno orodje, ki za klasifikacijo zaporedij uporablja orodji BLAST in HMMer (programski paket, ki vključuje –hmmsearch, tj. iskalnik homolognih zaporedij na podlagi predustvarjenih profilov skritih modelov Markova). Za opredelitev taksonomske sestave metagenoma orodje upošteva najboljše zadetke, pridobljene z algoritmom BLAST (Mavromatis in sod., 2009). **MG-RAST** (*the metagenomics rapid annotation using subsystem technology*; dostopno na <http://metagenomics.anl.gov/>) v.3 zaporedja anotira z algoritmom BLAT (*BLAST-like alignment tool*; Kent, 2002), ki je od BLAST-a hitrejši, vendar manj zanesljiv. Orodje poda tri različne interpretacije: (a) najboljši zadetek, (b) reprezentativni zadetek in (c) najbližji skupni prednik (ang. *lowest common ancestor*, LCA). Algoritem LCA vsako zaporedje taksonomsko razvrsti le do tistega nivoja, ki je podprt z referenčnimi podatki (Wilke in sod., 2013).

Razvrščanje zaporedij glede na filogenijo izvajamo le do tistega taksonomskega nivoja natančno, ki je podprt z zaporedji v referenčni podatkovni zbirki in z izbranim evolucijskim modelom (Wu in Eisen, 2008; Berger in sod., 2011). Pogosto jih uporabljamo za analizo filogenetsko informativnih označevalskih genov (Wu in Eisen, 2008). Pri delu smo uporabili tri orodja. **AMPHORA** (*A pipeline for automated phylogenomic inference*; Wu in Scott, 2012) omogoča filogenetski opis kodirajočih zaporedij s pomočjo predhodno izdelanih profilov HMM. Vhodna zaporedja primerja s podatkovno zbirko filogenetsko informativnih genov bakterijskega (31 genov) in arhejskega (104 geni) izvora. Vhodna zaporedja nato umesti na fiksno referenčno filogenetsko drevo z algoritmoma RAxML EPA (Berger in sod., 2011) ali pplacer (Matsen in sod., 2010) z metodo največjega verjetja ali Bayesianove inference. **MLTreeMap** omogoča filogenetsko uvrstitev metagenomskih zaporedij, ki so filogenetski in/ali funkcijski označevalski geni. Orodje z algoritmom BLAST prepozna označevalske gene, jih poravna s homolognimi referenčnimi zaporedji in filogenetsko umesti na referenčno drevo z orodjem RAxML. Omogoča tudi pripis vrednosti *bootstrap* za opredelitev zanesljivosti vejanja (Stark in sod., 2010). **RAxML EPA** (*Randomized accelerated maximum likelihood evolutionary placement algorithm*) uporablja metodo največjega verjetja in vsaki poizvedbi posebej določi njen optimalni položaj na referenčnem filogenetskem drevesu. Algoritem zahteva (a) referenčno filogenetsko drevo in (b) poravnavo zaporedij, ki vključuje na referenčno poravnavo poravnane poizvedbe (Berger in sod., 2011; Stamatakis, 2014).

Razvrščanje zaporedij glede na sestavo opredelimo na glede na vsebnost baznih parov GC, rabo kodonov ali frekvenco *k*-merov. Metode so hitrejše, a manj zanesljive od metod, ki temeljijo na poravnavi zaporedij, in lahko pripišejo taksonomijo vsem zaporedjem (Bazinet in Cummings, 2012). Pri delu smo uporabili dve orodji. **NBC** (*The Naïve Bayes Classifier tool*) je naivni Bayesov klasifikator. Uporablja algoritem, ki temelji na pojavnosti izbranih nukleotidnih *k*-merov ($k = 3, 6, 9, 12$ ali 15) v metagenomu, ki so specifični za posamezne taksone in predstavljajo filogenetski signal (Pride in sod., 2003; Rosen in sod., 2011). **RDP Classifier** (*Ribosomal Database Project Classifier*) je naivni Bayesov klasifikator zaporedij genov za 16S rRNA. Poizvedbam pripiše filogenetsko umestitev glede na Bergeyjevo klasifikacijo prokariotov. Orodje je najbolj zanesljivo v primeru variabilnih regij V2 in V4 gena za 16S rRNA in nezanesljivo pri poizvedbah, krajših od 50 bp (Wang in sod., 2007). RDP omogoča tudi pripis vrednosti *bootstrap* za opredelitev zanesljivosti vejanja.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA POTEKA DELA



Slika 3: Shematski prikaz poteka dela

3.2 KEMIČALIJE IN DROBNA OPREMA

0,1 cm elektroporacijske kivete

1-butanol

agar MacConkey

agaroz

ampicilin (Na-sol)

aparatura za elektroforezo »HE33 Mini

Horizontal Submarine Unit«

aparatura za PCR »MyCycler«

avtomatske pipete Eppendorf

baza TRIS

borova kislina

bromfenolmodro

bukov ksilan

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$

centrifuga Rotanta 460R

D-(+)-glukoza

DNA-polimeraza *Taq*

EDTA

elektroforeza v pulzirajočem polju »CHEF-DR

III variable angle system«

elektroforezni napajalnik »2301 Macrodrive 1

power supply«

elektroporator Electroporator 2510

eskulin hidrat

Bio-Rad (ZDA)

Merck (Nemčija)

Formedium (Združeno kraljestvo)

Carl Roth (Nemčija)

Sigma-Aldrich (ZDA)

Hoeffer (ZDA)

Bio-Rad (ZDA)

Eppendorf (Nemčija)

Sigma-Aldrich (ZDA)

Merck (Nemčija)

Sigma-Aldrich (ZDA)

Sigma-Aldrich (ZDA)

Acros Organics (Velika Britanija)

Hettich (Nemčija)

Kemika (Hrvaška)

Thermo Scientific (Združeno kraljestvo)

Sigma-Aldrich (ZDA)

Bio-Rad (ZDA)

LKB Bromma (Švedska)

Eppendorf (Nemčija)

Sigma-Aldrich (ZDA)

etanol	ECP (Slovenija)
etidihev bromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich (ZDA)
Fast digest <i>EcoRI</i>	Thermo Scientific (Združeno kraljestvo)
Fast digest <i>HindIII</i>	Thermo Scientific (Združeno kraljestvo)
fenol	Merck (Nemčija)
glicerol	Polichimica S.R.L. Societa' Socio Unico (Italija)
gojišče Luria-Bertani (LB)	Carl-Roth (Nemčija)
hitin iz oklepov rakovic	Sigma-Aldrich (ZDA)
IPTG	Sigma-Aldrich (ZDA)
izoamilalkohol	Kemika (Hrvaška)
K ₂ HPO ₄	Merck (Nemčija)
kalijev hidroksid (KOH)	Sigma-Aldrich (ZDA)
karboksimetilceluloza (Na-sol, srednja viskoznost)	Sigma-Aldrich (ZDA)
kloramfenikol	Sigma-Aldrich (ZDA)
kloroform	Merck (Nemčija)
klorovodikova kislina (HCl) (≥ 37 %)	Sigma-Aldrich (ZDA)
komplet »CopyControl Fosmid Library Production Kit«	Epicentre (ZDA)
komplet »QIAprep Spin Miniprep Kit«	Qiagen (ZDA)
komplet »QIAquick Gel Extraction Kit«	Qiagen (ZDA)
kongo rdeče	Merck (Nemčija)
ksilencianol	Sigma-Aldrich (ZDA)
kvasni ekstrakt	Biolife (Združeno kraljestvo)
L-(+)-arabinoza	Merck (Nemčija)
ledocetna kislina	Sigma-Aldrich (ZDA)
lugolova raztopina	Merck (Nemčija)
magnetno mešalo MM540	Tehtnica (Slovenija)
maltoza	Kemika (Hrvaška)
MgSO ₄ × 7H ₂ O	Acros Organics (Združeno kraljestvo)
namizna centrifuga Eppendorf 5424	Eppendorf (Nemčija)
natrijev dodecilsulfat (SDS)	Carl-Roth (Nemčija)
natrijev klorid	Merck (Nemčija)
pepton (mesni)	Merck (Nemčija)
pGEM [®] T Vector System II	Promega (ZDA)
Pufer »6× Fast Digest Buffer«	Thermo Scientific (Združeno kraljestvo)
s kislino sprane steklene kroglice premera 150–212 µm in 425–600 µm	Sigma-Aldrich (ZDA)
saharoza	Kemika (Hrvaška)
spektrofotometer Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific (Združeno kraljestvo)

streptomycin	Sigma-Aldrich (ZDA)
tehnica KERN PFB	Balingen-Frommern (Nemčija)
tributirin (98 %)	Acros Organics (Združeno kraljestvo)
Tween 20 (polisorbat 20)	Sigma-Aldrich (ZDA)
Tween 80 (polisorbat 80)	Sigma-Aldrich (ZDA)
ultrasonični procesor »Vibra-Cell VCX 500 – VCX 750«	Sonics (ZDA)
UV-presvetljevalnik »G:BOX F3«	Syngen
vodna kopel Multitemp II 2219	LKB Bromma (Švedska)
vodotopni škrob iz krompirja	Sigma-Aldrich (ZDA)
vrtnični stresalnik RC-TK	Infos HT (Švica)
X-gal	Sigma-Aldrich (ZDA)
železov amonijev citrat	Sigma-Aldrich (ZDA)
železov citrat	Sigma-Aldrich (ZDA)

3.3 RAZTOPINE, PUFRI

Izolacija plazmidne DNA z alkalno lizo:

Raztopina I

50 mM glukoza
 25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 10 mM EDTA (pH 8,0)

Raztopina II

0,2 M NaOH
 1 % SDS

Raztopina III

60 ml 5 M K-acetata
 11,5 ml ledocetne kisline
 28,5 ml dH₂O

Pufer za ekstrakcijo DNA

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 100 mM Na-EDTA (pH 8,0)
 1,5 M NaCl

Top agar CT6

8 g agarja
 0,2 g K₂HPO₄
 1 g MgSO₄ × 7H₂O
 pH 7,5.

Pufer za redčitev fagov

10 mM Tris-HCl (pH 8,3)
 100 mM NaCl
 10 mM MgCl₂

Pufer TE

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 1 mM Na-EDTA (pH 8,0)

Založna raztopina Mg²⁺ ionov

20,33 g MgCl₂ × 6H₂O
 24,65 g MgSO₄ × 7H₂O
 dopolnimo z vodo do 100 ml

10 % raztopina Tween 20/80

10 ml Tween 20 ali Tween 80
 90 ml dH₂O (T=60-70°C)

Koloidni hitin

5 g hitina, 60 ml ledeno hladne koncentrirane (≥ 37 %) HCl. Mešamo 30 min, prefiltriramo (gaza), počasi dodamo k 2 l hladne dH₂O, mešamo 60 min, inkubiramo pri 4 °C preko noči, odlijemo supernatant in usedlino spiramo z vodo do pH ≥ 4,0. pH uravnemo z 1 M KOH na 7,2. Koncentracijo hitina v založni raztopini določimo s prekonočno inkubacijo 1 ml koloidnega hitina pri 55 °C.

3.4 BAKTERIJSKI IN GLIVNI SEVI

Bakterijski in glivni sevi, ki smo jih uporabili v tem delu, so predstavljeni v Preglednici 2.

Preglednica 2: Seznam uporabljenih bakterijskih in glivnih sevov

Sev	Genotip
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>
<i>E. coli</i> EPI300-T1 ^R	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) (Str ^R) Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ ⁻ <i>rpsL</i> <i>nupG</i> <i>trfA</i> <i>tonA</i> <i>dhfr</i>
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	divji tip
<i>Bacillus subtilis</i> PY219	divji tip
<i>Cellulomonas uda</i> DSM20108	divji tip
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	divji tip
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EXF-5822 EtOH Red*	divji tip
<i>Serratia marcescens</i> EXB V-15*	divji tip

*Sev je trajno shranjen in vključen v zbirko EX, ki je del Mreže infrastrukturnih centrov Univerze v Ljubljani (MRICUL) in deluje v okviru IC Mycosmo na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.5 GOJIŠČA

Vsa gojišča smo pred uporabo avtoklavirali v avtoklavu A-21 CA (Kambič) pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 121 °C 15 min. Pri pripravi trdnih gojišč smo dodali 15 g agarja na liter gojišča, gojišče smo avtoklavirali in vlili v petrijevke. Po potrebi smo termostataranim (55 °C) gojiščem dodajali kloramfenikol (12,5 μg/ml), ampicilin (100 μg/ml), streptomycin (80 μg/ml), L-arabinozo (0,01 % (w/v)), IPTG (0,5 mM) in/ali X-gal (20 mg/ml). Za 1 liter gojišč smo potrebovali:

Gojišče LB

25 g gojišča LB

Mehki agar LB

25 g gojišča LB

6 g agarja

Gojišče YPD

10 g kvasnega ekstrakta

20 g peptona

20 g glukoze

Mehki agar YPD

10 g kvasnega ekstrakta

20 g peptona

20 g glukoze

6 g agarja

Gojišče MacConkey

50 g gojišča MacConkey

Založna raztopina Mg²⁺ ionov

20,33 g MgCl₂ × 6H₂O

24,65 g MgSO₄ × 7H₂O

dopolnimo z vodo do 100 ml

SOC

2 g Bacto-triptona

0,5 g Bacto-kvasnega ekstrakta

1 ml 1 M NaCl

0,25 ml 1 M KCl

1 ml 2 M založne raztopine magnezijevih Mg²⁺ ionov

1 ml 2 M glukoze

3.6 PRESEJALNI TESTI ZA ZAZNAVO ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Gojišča za zaznavo encimske aktivnosti so vsebovala (a) Cm v končni koncentraciji 12,5 µg/ml (selekcija na fozmid) in (b) Ara v končni koncentraciji 0,01 % (w/v) za namnožitev fozmida v več kopij na celico. Kot negativno kontrolo smo uporabili sev *E. coli* EPI300-T1^R s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka. V primeru, da je način zaznave zahteval destrukcijo celic (amilazna, endoglukanazna aktivnost), smo replike kolonij zagotovili z odtisom kolonij na žamet in nato na trdna gojišča. Sestava indikatorskih gojišč, princip zaznave encimske aktivnosti in uporabljeni bakterijski kontrolni sevi so predstavljeni v Preglednici 3.

Preglednica 3: Diferencialna indikatorska trdna gojišča, ki smo jih uporabili za zaznavo encimske aktivnosti

Indikatorsko gojišče (1 l)	Čas inkubacije	Princip zaznave	Pozitivna kontrola
<u>Amilazna aktivnost (hidroliza škroba)</u>			
25 g gojišča LB 15 g agarja 10 g vodotopnega škroba	48–72 ur	Prelitje z lugolovo raztopino. Belo do rumeno-rjavo razbarvanje okoli amilaza pozitivne kolonije na vijoličnem ozadju (Rondon in sod., 2000).	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42
<u>Beta-glukozidazna aktivnost (hidroliza eskulina; Liu in sod., 2011)</u>			
25 g gojišča LB 1 g eskulin hidrata 2,5 g železovega amonijevega citrata	12 ur	Beta-glukozidaza cepi eskulin v eskuletin, ki reagira z Fe ³⁺ ioni. Pri tem nastane črno obarvan kompleks (Eberhart in sod., 1964).	<i>Serratia marcescens</i> EXB V-15
<u>Endoglukanazna aktivnost (hidroliza karboksimetilceluloze; Liu in sod., 2011)</u>			
25 g gojišča LB 15 g agarja 5 g karboksimetilceluloze	72 ur	Kolonije odstranimo s 70 % EtOH in prelijemo s 0,2 % raztopino kongo rdečega (30 min). Razbarvamo z 1 M NaCl (15 min). Kongo rdeče se ne veže na razgrajeno karboksimetil celulozo, kar opazimo kot belo do rumeno razbarvanje okoli kolonij (Teather in Wood, 1982).	<i>Cellulomonas uda</i> DSM20108
<u>Esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza detergentov Tween 20/80; Rondon in sod., 2000)</u>			
25 g gojišča LB 15 g agarja 10 ml Tween 20/80	24–48 ur	Cona bele oborine okoli kolonij na prosojnem ozadju (Rondon in sod., 2000)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
<u>Esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza tributirina; Rondon in sod., 2000)</u>			
20 g gojišča LB 12 g agarja 10,4 ml 98-odstotnega tributirina, dodamo po avtoklaviranju, soniciramo 10 min pri amplitudi 40	72 ur in 3–5 dni pri 4 °C	cona zbistritve okoli kolonije na mlečnato belem ozadju	<i>P. aeruginosa</i> PAO-1

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 4: Diferencialna indikatorska trdna gojišča, ki smo jih uporabili za zaznavo encimske aktivnosti

Indikatorsko gojišče (1 l)	Čas inkubacije	Način zaznave	Pozitivna kontrola
<u>Fosfolipazna/lipazna aktivnosti (hidroliza lecitina; Chrisope in sod., 1978; Barrow in Feltham, 2004; Kauffmann in Schmidt-Dannert, 2001)</u>			
25 g gojišča LB 15 g agarja 2 jajčna rumenjaka	72 ur	cona bele oborine (fosfolipaza C), zbistritev (fosfolipaza A) na rumenkastem ozadju, oljnat sijaj na površju in v okolici (lipaza) ali cona bele oborine na robu ali pod kolonijo	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
<u>Hitinazna aktivnost (hidroliza koloidnega hitina)</u>			
Klone nacepimo na LB Cm Ara. Po 48 urah prelijemo s 3,5 ml top agarja CT6 z 0,5 % koloidnim hitinom	72 ur in 3–5 dni pri 4 °C	zbistritev okoli hitinaza pozitivne kolonije na motnem (belkastem) ozadju (Rondon in sod., 2000).	<i>S. marcescens</i> EXB V-15
<u>Ksilanazna aktivnost (hidroliza ksilana; Liu in sod., 2011)</u>			
25 g gojišča LB 15 g agarja 5 g bukovega ksilana	72 ur	belo do rumeno obarvanje okoli kolonije na svetlo rjavem ozadju.	<i>C. uda</i> DSM20108
<u>Lipazna aktivnost (hidroliza olivnega olja; Singh in sod., 2006)</u>			
25 g gojišča LB 15 g agarja 100 mg fenol rdeče pH 7,4 avtoklaviramo in dodamo 8 ml sterilnega olivnega olja, 1112 mg CaCl ₂ soniciramo 10 min pri amplitudi 40	72 ur in 3–5 dni pri 4 °C	rumeno obarvanje okoli lipaza pozitivne kolonije na rdečem ozadju (Rajan in sod., 2011)	<i>P. aeruginosa</i> PAO1
<u>Proteazna aktivnost (hidroliza kazeina; Rondon in sod., 2000)</u>			
25 g gojišča LB 15 g agarja 10 g posnetega mleka v prahu, avtoklaviramo ločeno	72 ur	zbistritev okoli proteaza pozitivne kolonije na mlečnato belem ozadju.	<i>P. aeruginosa</i> PAO1

3.7 PRESEJALNI TESTI ZA ZAZNAVO PROTIMIKROBNE AKTIVNOSTI

Klone, ki izločajo snovi, ki delujejo protibakterijsko, smo iskali po nekoliko modificiranem protokolu, opisanem v Chung in sod. (2008). Klone smo na trdnih gojiščih LB Cm Ara gojili tri dni pri 37 °C in jih nato prelili z 3,5 ml mehkega agarja LB, termostataranega na 48 °C, ki smo mu dodali 200 µl prekonočne kulture *E. coli* DH5α pTV24 (Cm^R) oziroma *B. subtilis* PY219 (Cm^R). Plošče smo pregledali vsakih 24 ur in rezultat imeli za pozitiven, če smo opazili cono zbistritve okoli kolonije. Pozitivne klone smo s sterilnim zobotrebcom prepikirali na agar MacConkey, ki onemogoča rast grampozitivnih bakterij, zato metoda ni nujno destruktivna (ne zahteva replik).

Klone s protiglivno aktivnostjo smo na trdnih gojiščih LB Cm Ara gojili tri dni pri 37 °C in jih nato prelili s 5 ml mehkega agarja YPD, ki smo mu dodali 300 µl prekonočne kulture *Saccharomyces cerevisiae* EXF-5822 EtOH red, ki je naravno odporna proti

kloramfenikolu (Chung in sod., 2008). Plošče smo pregledali vsakih 24 ur in rezultat imeli za pozitiven, če smo opazili cono zbistritve okoli kolonije. Pozitivne klone smo s sterilnim zobotrebcem prepikirali na gojišče, ki je vseboval cikloheksimid, zato metoda ni nujno destruktivna (ne zahteva replik).

V vseh primerih smo kot pozitivno kontrolo uporabili seva *P. aeruginosa* PAO1 (velika cona inhibicije) in *Serratia marcescens* EXB V-15 (majhna cona inhibicije), kot negativno kontrolo pa gostiteljski sev *E. coli* EPI300 T1^R s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka.

3.8 PRESEJALNI TEST ZA ZAZNAVO KLONOV S SPREMENJENO MORFOLOGIJO ALI PIGMENTACIJO

Klone smo na vseh diferencialnih in selektivnih trdnih gojiščih za iskanje klonov s hidrolazno ali protimikrobno aktivnostjo dodatno pregledovali za spremenjeno morfologijo in/ali obarvanje po dvo- ali večdnevni inkubaciji plošč pri 37 °C. Tako kot pri antibiotiki so pri spremembi pigmentacije ali morfologije kolonije pogosto udeležene majhne biološko aktivne molekule (Craig in sod., 2010).

3.9 VZORČENJE

Vzorci mikrobnih prevlek sive in rožnate barve so bili sterilno odvzeti maja 2011 v 55 m dolgi Pajsarjevi jami, ki se nahaja 20 km jugozahodno od Ljubljane, v bližini mesta Vrhnika (45 ° 49'51 " N, 14 ° 16'15 " E), ter v jami Vjetrenica, ki se nahaja v Bosni in Hercegovini v bližini mesta Zavala (42 ° 84'59 " N, 17 ° 98'41" E). V času vzorčenja je bila v obeh jamah temperatura zraka 12,0 °C, relativna vlažnost pa 100 %. Sveže vzorce smo do vrnitve v laboratorij hranili v ledeni kopeli in do uporabe shranili pri –80 °C.

3.10 IZOLACIJA OKOLJSKE DNA IZ JAMSKIH MIKROBNIH PREVLEK

Celokupno DNA iz jamskih mikrobnih prevlek smo izolirali po modificirani metodi, ki so jo opisali Pang in sod. (2008). K 0,25 g vzorca jamskih mikrobnih prevlek smo dodali 1 ml pufra za ekstrakcijo DNA in 6 µl lizocima v končni koncentraciji 0,2 mg/ml. V mikrocentrifugirko smo dodali s kislino sprane steklene kroglice s premerom por 150–212 µm (Sigma-Aldrich), 425–600 µm (Sigma-Aldrich) in 3 µm (MoBio). Vzorec smo inkubirali eno uro pri 37 °C in med inkubacijo vzorec vsakih 15 min mešali 2–3 min na vrtničnem mešalu. Nato smo dodali 120 µl 10-odstotnega SDS in 2 µl proteinaze K (19,8 mg/ml) in vzorec inkubirali 2 uri pri 65 °C. Vzorec smo centrifugirali 10 min pri 10.000 vrt./min in supernatant prenesli v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo ½ V raztopine PEG 8000 (30 %, w/v)/ NaCl (1,6 M) in smo DNA obarjali preko noči pri sobni temperaturi. Po obarvanju smo vzorec centrifugirali 10 min pri 10.000 vrt./min in odstranili supernatant. Pelet smo resuspendirali v 500 µl pufra TE. Dodali smo 1 V predpripravljene zmesi fenol : kloroform : izoamilalkohol (FKI; 25: 24 : 1, v/v/v), in mešali s tresenjem pribl. 1 min. Vzorec smo centrifugirali pri 5 min pri 13.000 vrt./min in zgornjo vodno raztopino prenesli v novo mikrocentrifugirko. Zgornji vodni raztopini smo dodali 1 V zmesi kloroform : izoamilalkohol (KI; 24 : 1, v/v) in mešali s tresenjem 1 min. Centrifugirali smo 5 min pri 13.000 vrt./min in zgornjo vodno raztopino prenesli v novo mikrocentrifugirko. Postopka

ekstrakcije in čiščenja DNA z raztopinama FKI in KI smo ponovili. Okoljsko DNA smo oborili z 0,1 V 5 M NaCl in 2,5 V 96-odstotnega etanola in centrifugirali 30 min pri 13.000 vrt./min in 4 °C. Supernatant smo odstranili, usedlino sprali s 70-odstotnim etanolom in ga posušili v laminariju. Oborjeno DNA smo raztopili v 10 µl pufra TE in jo do uporabe shranili pri –20 °C.

Velikost in stopnjo fragmentiranosti okoljske DNA smo opredelili tako, da smo 1 µl okoljske DNA ločili z gelsko elektroforezo v pulzirajočem električnem polju v 1-odstotnem agaroznem gelu. Razmere elektroforeznega ločevanja so bile: 0,5 × pufer TBE, čas 20 ur, napetost 6 V/cm, začetni čas preklopa 0,1 s, končni čas preklopa 2 s, kot 120°, temperatura 14 °C.

3.11 IZOLACIJA FOZMIDNE DNA

Fozmidno DNA smo izolirali po nekoliko modificiranem protokolu za **alkalno lizo**, opisanem v Birnboim in Doly (1979). Centrifugirali smo 1,5–3 ml prekonočne kulture 1 min pri 13.000 vrt./min. Celice smo resuspendirali v 100 µl ledeno hladne raztopine I, ji dodali 200 µl raztopine II in inkubirali 5 min v ledeni kopeli. Lizat smo nevtralizirali z dodajanjem 150 µl ledeno hladne raztopine III. Po 5-minutni inkubaciji v ledeni kopeli smo ostanek celičnih sten in denaturirane proteine odstranili s centrifugiranjem 10 min pri 13.000 vrt./min in 4 °C. DNA smo očistili s fenolno ekstrakcijo, kot je opisano v poglavju 3.10, in jo oborili z dodatkom 2,5 V 96-odstotnega etanola. Centrifugirali smo 10 min pri 13.000 vrt./min in 4 °C. Usedlino DNA smo sprali z 80-odstotnim etanolom, posušili in oborjeno DNA raztopili v 50 µl dH₂O, ki smo ji dodali 1 µl RNaze A (10 mg/ml). Fozmidno DNA smo do uporabe shranili pri –20 °C.

Fozmidno DNA smo izolirali tudi s komercialnim kompletom »**QIAprep[®] Spin Miniprep Kit**« (Qiagen) iz 3 ml prekonočne kulture po navodilih proizvajalca. Poleg tega smo fozmidno DNA smo skušali izolirati tudi z metodo z **1-butanolom**, opisano v Brieger in sod. (2010). K 500 µl prekonočne kulture *E. coli* smo dodali 1 ml 1-butanola in 50 mg s kislino spranih kroglic premera 425–600 µm (Sigma). Vzorec smo homogenizirali z 20-sekundnim mešanjem na vrtničnem mešalniku. Sledilo je enominutno centrifugiranje vzorca pri 14.000 vrt./min. Spodnjo vodno raztopino smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in plazmidno DNA oborili z dodatkom 0,8 V izopropanola. Usedlino DNA smo dvakrat sprali z 70-odstotnim etanolom in oborino DNA raztopili v 10 µl H₂O.

3.12 UGOTAVLJANJE ČISTOSTI IN KONCENTRACIJE DNA

Čistost in koncentracijo DNA smo ugotavljali spektrofotometrično (NanoDrop, Thermo Scientific) z merjenjem A_{260} , A_{280} in A_{230} . Ob tem upoštevamo, da absorbanca $A_{260} = 1$ ustreza koncentraciji 50 µg/ml za dvoverižne molekule DNA (Thermo Scientific, 2008). DNA smo imeli za čisto, če je bilo razmerje A_{260}/A_{280} med 1,8 in 2,0 in če je bilo razmerje A_{260}/A_{230} med 2,0 in 2,2.

3.13 PRIPRAVA IN ANALIZA KLONSKIH KNJIŽNIC GENOV ZA 16S rRNA

Gene za 16S rRNA smo iz okoljske rožnatih mikrobnih prevlek DNA pomnožili s *Taq*-polimerazo ter začetnima oligonukleotidoma 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') in 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'), kot je opisano v Porca in sod. (2012). Razmere verižne reakcije s polimerazo so bile: začetna denaturacija DNA pri 94 °C (5 min), ki ji sledi 25 ciklov 94 °C (1 min), 50 °C (25 s), 72 °C (2 min) in zaključno podaljševanje pri 72 °C (20 min).

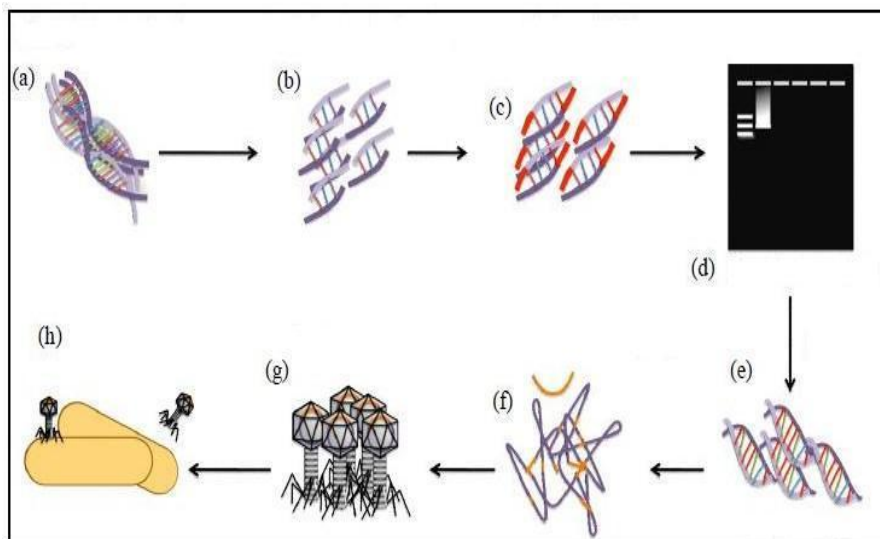
Klonski knjižnici genov za 16S rRNA smo pripravili s komercialnim kompletom »pGEM[®] T-Easy Vector System« po navodilih proizvajalca (Promega). Okoljske gene za 16S rRNA smo naključno klonirali v vektor pGEM[®] T-Easy in jih vnesli v celice *E. coli* JM109. Naključno smo izbrali 96 za vključek pozitivnih klonov, ki so jim nukleotidno zaporedje določili v podjetju Macrogen (Koreja).

Iz nabora analiziranih zaporedij smo himere odstranili z orodjem Bellerophon (Huber in sod., 2004). Zaporedja smo z orodjem Mothur v.1.34.0 (Schloss in sod., 2009) združili v operacijske taksonomske enote na podlagi 3-odstotne razlike v evolucijskih razdaljah. V okvirju projekta »Po kreativni poti do praktičnega znanja: Bioinformatika za obdelavo bioloških podatkov« smo analiziranim zaporedjem poiskali najpodobnejša zaporedja genov za 16S rRNA in izrisali preliminarne filogenetske drevese (Pangerčič in sod., 2014). Končni nabor zaporedij smo poravnali s ClustalOmega (Sievers in sod., 2011) in končni filogenetski drevesi izrisali s programom MEGA6 z metodo največjega verjetja. Vrednosti podpore *bootstrap* smo jih opredelili z neparametričnim testom samovzorčenja (*bootstrap*) s 1000 ponovitvami.

3.14 PRIPRAVA METAGENOMSKIH FOZMIDNIH KNJIŽNIC IZ ROŽNATIH IN SIVIH JAMSKIH MIKROBNIH PREVLEK

Fozmidni knjižnici smo pripravili s kompletom »CopyControl Fosmid Library Production Kit« po navodilih proizvajalca (Epicentre, 2012a). Glavni koraki pri pripravi fozmidne knjižnice so predstavljeni v Sliki 4.

Štrleče konce okoljske DNA smo spremenili v tope 5'-fosforilirane konce z encimsko mešanico »End-Repair Enzyme Mix«. Velikost DNA smo opredelili s gelsko elektroforezo v pulzirajočem polju »CHEF-DR III Variable Angle System« (Bio-Rad) v 1-odstotnem agaroznem gelu iz nizkotališčne agaroze. Razmere ločevanja so bile: 0,5 × pufer TBE, čas ločevanja 15 ur, začetni čas preklopa 0,05 s, končni čas preklopa 10 s, napetost 7 V/cm. Iz stolpca z okoljsko DNA smo izrezali agarozno kocko s fragmenti velikosti 36–42 kb. Agarozno kocko smo stopili s 15-minutno inkubacijo pri 70 °C, jo termostatirali pri 45 °C in agarozo razgradili z encimsko mešanico »GELase Enzyme Preparation«. Nerazgrajene oligosaharide smo odstranili s centrifugiranjem. DNA smo oborili z dodatkom 1/10 V 3 M natrijevega acetata in 2,5 V absolutnega etanola, jo dvakrat sprali s 70-odstotnim etanolom in jo posušili. Usedlino DNA smo resuspendirali v 3 µl pufru TE.



Slika 4: Shema priprave fosmidne knjižnice (Cruz in sod., 2010: 1473). (a) Izolacija okoljske DNA, (b) fragmentacija okoljske DNA na želeno velikost (≈ 40 kb), (c) tvorba 5'-fosforiliranih koncev DNA, (d) ločitev okoljske DNA s PFGE, (e) ekstrakcija DNA velikosti ≈ 40 kb iz agarozne kocke, (f) ligacija okoljske DNA primerne velikosti ≈ 40 kb v fosmidni vektor pCC1FOS, (g) pakiranje fosmidov z vključki v pakirne ekstrakte faga λ , (h) okužba celic *E. coli* z rekombinantnim fagom λ .

Pripravili smo 10 μ l ligacijsko mešanico, ki je vsebovala 3 μ l dH₂O, 1 μ l raztopine »Fast-Link DNA Ligase«, 1 μ l 10 mM ATP, 1 μ l 1 $\times$ Fast-Link Ligation Buffer, 1 μ l vektorja pCC1FOS in 3 μ l okoljske DNA velikosti ≈ 40 kb. Mešanico smo inkubirali 4 ure pri sobni temperaturi in inaktivirali z 10-minutno inkubacijo pri 70 °C. K 10 μ l ligacijske mešanice smo dodali 25 μ l pakirnega ekstrakta faga λ (»MaxPlax Lambda Packaging Extract«) in inkubirali 90 min pri 30 °C. Postopek dodajanja pakirnega ekstrakta smo ponovili. Po končani inkubaciji smo mešanico dopolnili do 1 ml s pufrom za redčitev fagov in ji dodali 25 μ l kloroforma. Gostiteljski sev *E. coli* EPI300-T1^R smo nagojili v gojišču LB z 10 mM MgSO₄ do optične gostote OD₆₀₀ = 0,8–1,0. Po 100 μ l tako pripravljenih celic smo odpipetirali v 50 mikrocentrifugirk in v vsaki dodali 10 μ l sestavljenih fagnih delcev. Mikrocentrifugirke smo inkubirali 20 min pri 30 °C in okužene celice nacepili na 50 selektivnih trdnih gojišč LB Cm ter gojišča inkubirali preko noči pri 37 °C.

Fosmidna knjižnica iz sivih mikrobnih prevlek je vključevala 500 za vključek pozitivnih klonov. Klone smo napikirali na trdna gojišča LB Cm (100 klonov na ploščo, t. i. *master plates*). Fosmidno knjižnico iz sivih mikrobnih prevlek (500 klonov) smo shranili v 6 mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami tako, da smo vsak klon nacepili v svojo jamico s 300 μ L gojišča LB Cm, nacepljene mikrotitrskne plošče inkubirali 2 dneva pri 37 °C in gojišču nato dodali glicerol v končni koncentraciji 15 % (w/w) ter plošče shranili pri –80 °C. Fosmidna knjižnica iz rožnatih mikrobnih prevlek je imela 70.000 klonov. Zaradi pomanjkanja prostora za shranjevanje posameznih klonov kot trajnih kultur v jamicah (730 mikrotitrskih plošč s 96 jamicami) smo knjižnico shranili kot pomnoženo fosmidno knjižnico. Slednjo smo pripravili tako, da smo kolonije, ki so zrasle na trdnih gojiščih, resuspendirali v gojišču LB s 15-odstotnim (w/w) glicerolom in jih shranili pri –80 °C v petih različnih kriovialah.

3.15 PRIPRAVA ELEKTROKOMPETENTNIH CELIC *E. coli* IN ELEKTROPORACIJA

Elektrokompotentne celice *E. coli* EPI300-T1^R in DH5 α smo pripravili po protokolu Eppendorf, Protocol No. 4308 915.512. Prekonočno kulturo *E. coli* smo nacepili v novo tekoče gojišče LB in stresali do OD₆₀₀ = 0,5–0,6. Kulturo smo ohlajali 15 min v ledeni kopeli in po 25 ml kulture prenesli v štiri predohlajene centrifugirke. Centrifugirali smo 10 min pri 7.000 vrt./min in 4 °C, supernatant odlili in celice trikrat sprali z ledeno hladno vodo Milli Q. Celice smo enkrat sprali z 10-odstotnim (v/v) glicerolom, jih resuspendirali v 500 μ l 10-odstotnega (v/v) glicerola ter jih shranili pri –80 °C kot 100 μ l alikvote.

K 40 μ l elektrokompotentnih celic *E. coli* smo dodali 2 μ l fozmidne DNA in izvedli elektroporacijo v 0,1 cm elektroporacijskih kivetah (Bio-Rad) pri sledečih razmerah: napetost 1.320 V, časovna konstanta 5 ms, način O. Po elektroporaciji smo celicam dodali 1 ml predogretega (37 °C) gojišča SOC in kulturo stresali 1 uro pri 37 °C. Kulturo smo nato nacepili na selektivno trdno gojišče LB Cm. Gojišča smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

Izbitje fozmida iz klona iz fozmidne knjižnice smo dosegli z elektroporacijo po nekoliko modificiranem protokolu Heery in sod. (1989). Po 40 μ l elektrokompotentnih celic *E. coli* EPI300-T1^R s fozmidnim vektorjem z vključkom smo izpostavili elektroporaciji v 0,1 cm elektroporacijskih kivetah (Bio-Rad) pri sledečih razmerah: napetost 1.800 V, časovna konstanta 5 ms, način O. Po elektroporaciji smo celicam dodali 1 ml predogretega (37 °C) gojišča SOC in kulturo stresali 1 uro pri 37 °C ter nato nacepili na neselektivno trdno gojišče LB. Sto zraslih klonov smo nato napikirali na gojišče LB in odtisnili na žamet in nato na selektivno gojišče LB Cm. Vsa trdna gojišča smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.16 PRIPRAVA KEMIČNO KOMPETENTNIH CELIC *E. coli* S CaCl₂ IN TRANSFORMACIJA

Kemično kompetentne celice *E. coli* DH5 α in EPI300-T1^R smo pripravili po Seidman (2005). Po 1,5 ml prekonočne kulture *E. coli* smo inokulirali v 150 ml tekočega gojišča LB in stresali pri 37 °C do OD₆₀₀ = 0,3–0,4. Kulturo smo hladili 10 min v ledeni kopeli in razdelili v štiri 50 ml predohlajene centrifugirke ter centrifugirali 10 min pri 7.000 vrt./min in 4 °C. Celice smo resuspendirali v 7 ml predohlajenega 100 mM CaCl₂ in jih inkubirali 10 minut v ledeni kopeli. Centrifugirali smo 10 min pri 7.000 vrt./min in 4 °C. Celice smo resuspendirali v 500 μ l predohlajenega 100 mM CaCl₂ z 10-odstotnim (v/v) glicerolom in jih shranili pri –80 °C kot 100 μ l alikvote.

3.17 DOLOČITEV RESTRIKCIJSKEGA PROFILA VKLJUČKOV FOZMIDNE DNA

Restriksijski profil fozmidne DNA smo določili tako, da smo fozmidno DNA cepili z encimoma *Eco*RI in *Hind*III. Po 20 μ l restriksijske mešanice so vsebovale: 6 μ l fozmidne DNA, 1 μ l encima *Eco*RI, 1 μ l encima *Hind*III, 2 μ l pufra »6 $\times$ FD Buffer« in 10 μ l dH₂O. Restrikcija je tekla 15 min pri 37 °C. Reakcijo smo inaktivirali z 10-minutno inkubacijo pri 65 °C. Vzorce smo vnesli v jamice 0,8-odstotnega agaroznega gela, jih elektroforezno ločili in restriksijski profil opazovali pod UV-svetlobo.

3.18 POTRJEVANJE PRISOTNOSTI ZAPISA ZA AKTIVNOST V VKLJUČKIH POZITIVNIH KLONOV

Stabilnost aktivnosti smo preverili tako, da smo pozitiven klon večkrat nacepili na diferencialno gojišče. Aktivnost smo imeli za stabilno, če smo jo opazili v vsaj dveh ponovitvah. Prisotnost aktivnosti v vključku fozmidnega klona smo potrdili tako, da smo izoliran fozmid z elektroporacijo vnesli v izogeni sev *E. coli* EPI300-T1^R, ki je moral ponovno stabilno izražati preiskovano aktivnost. Pozitiven klon smo potrdili, če je bil restrikcijski profil fozmidne DNA enak pred in po elektroporaciji, in če smo na diferencialnem gojišču opazili stabilno aktivnost pred in po elektroporaciji (Slika 5).



Slika 5: Shema potrjevanja prisotnosti zapisa za aktivnost v vključkih pozitivnih klonov iz fozmidne knjižnice

3.19 *In silico* ANALIZE

Za izračun **povprečne velikosti bakterijskih in arhejskih genomov** smo iz podatkovne zbirke »EMBL Database« (dostopno na <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>) v januarju 2015 pridobili podatke o velikosti vseh sekvenciranih bakterijskih in arhejskih genomov. Izračunali smo njihovo povprečno velikost, standardni odklon, maksimalno in minimalno velikost ter razmerje med maksimalno in minimalno velikostjo bakterijskega in arhejskega genoma.

Velikost genov, ki kodirajo preiskovane hidrolaze, smo ocenili tako, da smo v podatkovni zbirki »NCBI Genes« (dostopno na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) za vsako od 8 preiskovanih hidrolaz poiskali zaporedja v 10 naključno izbranih genomih iz filogenetsko čim bolj oddaljenih bakterijskih vrst in izračunali povprečno velikost vsakega od preučevanih genov ter pripadajoči standardni odklon. Ocenili smo tudi **velikost genskih gruč NRPS/PKS**, vpletenih v sintezo aktinomicina, aktinorodina, avermektina, avilamicina, bacilibaktina, eritromicina, kuracina, pioluteorina, salinisporamida in stigmatelina.

Opredelitev taksonomske sestave metagenoma »Echo Passage«. Taksonomsko sestavo metagenoma »Echo Passage« smo sprva opredelili z orodji IMG/M, MG-RAST, AMPHORA in NBC Classifier. V vseh štirih primerih smo kot vhodno datoteko uporabili nukleotidna sestavljena metagenomska zaporedja (soseske).

Taksonomska uvrstitev zaporedij genov za 16S rRNA. Zaporedja genov za 16S rRNA smo taksonomsko uvrstili z orodji RAXML EPA (Berger in sod., 2011), MLTreeMap (Stark in sod., 2010) in RDP Classifier (Wang in sod., 2007). Za razvrščanje z orodjem RAXML EPA smo že anotiranim zaporedjem genov za 16S rRNA poiskali najpodobnejša zaporedja znotraj podatkovne zbirke »NCBI NR nucleotide database« z algoritmom BLASTn. Le-ta smo uporabili kot poizvedbo v podatkovni zbirki EzTaxon (Chun, 2012). Zaporedja smo poravnali s programom MAFFT (Katoh in Standley, 2013), določili najboljši model nukleotidne substitucije s programom MEGA6 (Tamura in sod., 2013) in fiksno referenčno drevo RAXML izrisali s programom raxmlGUI v.1.3.1 (Silvestro in Michalak, 2012). Kratka metagenomska zaporedja smo na referenčna poravnali z orodjem MAFFT (model –addfragments; Katoh in Frith, 2012) in jih umestili na referenčno filogenetsko drevo z algoritmom RAXML EPA (Berger in sod., 2011). Iz filogenetske analize smo izločili vsa metagenomska zaporedja, ki jih nismo mogli zanesljivo filogenetsko razvrstiti (dolge veje).

Filogenetski pripis izbranim funkcijskim označevalcem za kemolito(avto)trofijo v metagenomu »Echo Passage«. Že znana zaporedja funkcijskih označevalcev smo poiskali v podatkovni zbirki »NCBI Genes«, jih poravnali z orodjem MAFFT (Katoh in Standley, 2013) in jim z algoritmom –hmmbuild paketa HMMer 3.0 (Finn in sod., 2011) izdelali profile HMM. Slednje smo uporabili kot poizvedbo, s katero smo znotraj metagenoma poiskali homologna zaporedja (algoritem –hmmsearch). Obdržali smo tista zaporedja, ki so imela E-vrednost $\leq 10^{-5}$. Iz nadaljnje analize smo izločili tudi zaporedja, ki jih algoritem BlastP ni prepoznal kot preiskovane označevalce. Zaporedja, ki so bila najpodobnejša preiskovanim metagenomskim zaporedjem, smo poravnali z MAFFT. Z orodjem ProtTest 3.4 (Darriba, 2011) smo opredelili optimalni model aminokislinskih zamenjav in s programom RAXML (Stamatakis, 2014) izrisali fiksno referenčno filogenetsko drevo. Na že obstoječo poravnavo zaporedij smo poravnali metagenomska zaporedja z MAFFT (opcija –addfragments, Katoh in Frith, 2012) in jih na referenčno drevo umestili z algoritmom RAXML EPA (Berger in sod., 2011), pri čemer smo uporabili enak evolucijski model kot pri izdelavi fiksnega referenčnega drevesa. Iz končnega filogenetskega drevesa smo odstranili vsa metagenomska zaporedja, ki jih taksonomsko nismo mogli zanesljivo uvrstiti (dolge veje).

Identifikacija in analiza ketosintaznih (KS) in kondenzacijskih (C) domen v PKS/NRPS. S spletnim orodjem NaPDoS (*Natural Product Domain Seeker*) smo v metagenomu »Echo Passage« identificirali in analizirali gene z zapisom za ketosintazne (KS) in kondenzacijske (C) domene v PKS/NRPS. NaPDoS vhodna zaporedja prevede v 6 bralnih okvirjih, odstrani zaporedja, ki so krajša od izbrane minimalne dolžine ujemanja, identificira KS- in C-domene na podlagi skritih profilov Markova, poišče najpodobnejša zaporedja z algoritmom BlastP, odstrani dele poizvedb, ki ne predstavljajo KS- ali C-domen, poravna zaporedja z izbranimi zaporedji in jih filogenetsko uvrsti na fiksno

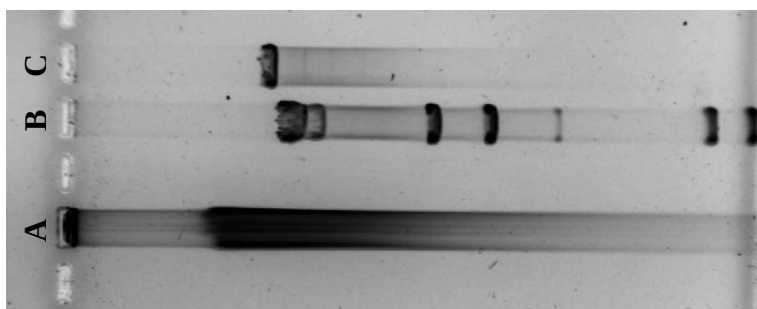
referenčno filogenetsko drevo z orodjem FastTree z metodo največjega verjetja (Ziemert in sod., 2012).

4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA OKOLJSKE DNA

Okoljsko DNA smo iz vzorca sivih in rožnatih mikrobnih prevlek izolirali po protokolu, ki so ga opisali Pang in sod. (2008) (glej poglavje 3.10). Čistost okoljske DNA smo opredelili spektrofotometrično, kot je opisano v poglavju 3.12. Iz 0,25 g vzorca sivih mikrobnih prevlek smo izolirali DNA s koncentracijo 2007,9 ng/ μ l in iz rožnatih prevlek s koncentracijo 1500,0 ng/ μ l. Ugotovili smo, da se je razmerje med A_{260} in A_{280} ter A_{260} in A_{230} za posamezen vzorec gibalo med 1,8 in 2,0 oziroma med 2,0 in 2,2. Sklepali smo, da je okoljska DNA zadosti čista za nadaljnje delo.

Velikost okoljske DNA smo opredelili z elektroforezo v pulzirajočem polju. Pripravili smo 1-odstotni agarozni gel in elektroforezo izvedli pri razmerah ločevanja: 6 V/cm, čas 11 h, začetni čas preklopa 0,1 s, končni čas preklopa 2 s, kot 120°, temperatura 14 °C. Ugotovili smo, da je večina okoljske DNA potovala kot fragmenti DNA, ki so večji od 22 kbp (Slika 6). Na gelu nismo opazili RNA. Sklepali smo, da je DNA primerne velikosti za nadaljnje delo.



Slika 6: Okoljska DNA iz sivih mikrobnih prevlek, ločena v 1-odstotnem agaroznem gelu s PFGE. (A) okoljska DNA iz sivih mikrobnih prevlek; (B) označevalec velikosti λ HindIII; (C) označevalec velikosti »Fosmid Control DNA« (42 kb).

4.2 PRIPRAVA KLONSKE KNJIŽNICE OKOLJSKIH GENOV ZA 16S rRNA IZ ROŽNATIH MIKROBNIH PREVLEK

Izolirano skupno mikrobno DNA smo uporabili kot matrico pri pomnoževanju genov za 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo. Za pomnoževanje smo uporabili začetna oligonukleotida 27 F in 1492 R, s katerima smo pomnožili okoli 1.500 bp dolg del genov za 16S rRNA. Produkta PCR smo ločili v 0,8-odstotnem agaroznem gelu (Slika 7) in jih iz gela očistili s kompletom »Qiaquick Gel Extraction Kit« (Qiagen, ZDA).



Slika 7: Elektroforezna ločitev pomnožkov genov za 16S rRNA iz okoljske DNA iz rožnatih mikrobnih prevlek. (A) označevalec velikosti »GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder«, (B) vzorec okoljske DNA iz rožnatih mikrobnih prevlek iz Pajsarjeve jame, (C) vzorec okoljske DNA iz rožnatih mikrobnih prevlek iz jame Vjetrenica.

Pomnožene gene smo naključno klonirali v vektor pGEM® T-Easy (Promega, ZDA) in rekombinantne vektorje vnesli v pripravljene kompetentne celice seva *E. coli* JM109, ki omogočajo zaznavo klonov z vključki z α -komplementacijo (β -galaktozidaznim modro-belim testom). Skupaj smo pripravili dve klonski knjižnici: eno iz rožnatih prevlek iz Pajsarjeve jame (Slovenija) in eno iz rožnatih prevlek iz jame Vjetrenica (BiH). Učinkovitost transformacije je pri obeh knjižnicah bila primerljiva in je znašala 10^8 CFU/ μ g DNA.

Klone, ki so vsebovali vključke, smo izbrali naključno. Iz vsake od knjižnic smo namnožili 48 izbranih klonov z vključkom v prekonočni kulturi v mikrotitrskih ploščah s 96 jamicami (vsaka jamica je vsebovala 300 μ l tekočega gojišča LB Ap). Tako pripravljenim klonom so določili nukleotidna zaporedja genov za 16S rRNA v podjetju Macrogen (Južna Koreja).

Vrstno sestavo rožnatih prevlek smo deloma opredelili v okviru projekta z naslovom »Po kreativni poti do praktičnega znanja: Uporaba bioinformatike za analizo bioloških podatkov«, ki smo ga v sodelovanju z Andrejem Pangerčičem izvedli vzporedno z magistrsko nalogo (Pangerčič in sod., 2014). Iz nabora analiziranih zaporedij smo himere odstranili z orodjem Bellerophon (Huber in sod., 2004). Zaporedja smo z orodjem mothur v.1.34.0 (Schloss in sod., 2009) združili v operacijske taksonomske enote na podlagi 97-odstotne podobnosti z uporabo algoritma najbližjega sosedu. Najpodobnejša zaporedja genov za 16S rRNA iz dobro karakteriziranih bakterijskih predstavnikov smo pridobili s pomočjo prosto dostopnega spletnega strežnika EzBioCloud (Kim in sod., 2012). Najpodobnejša zaporedja genov za 16S rRNA iz podatkovne zbirke »GenBank non-redundant database« smo pridobili z algoritmom Blastn. Najboljši model nukleotidne zamenjave smo izbrali z orodjem Prottest 3.4 (Darriba in sod., 2011). Preliminarna filogenetska drevesa smo izrisali po metodi najbližjega sosedu z orodjem MEGA6 (Tamura in sod., 2013).

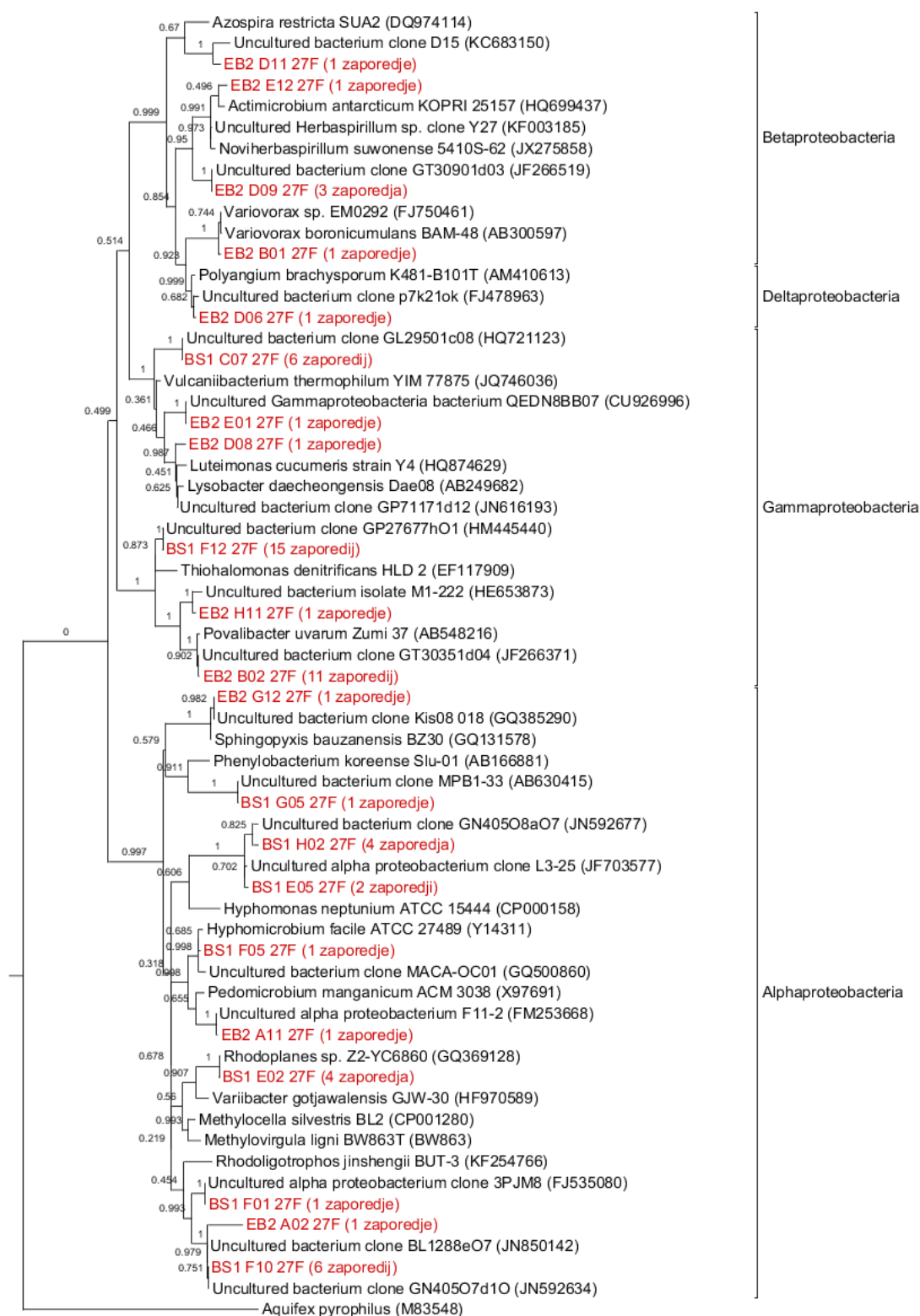
Na osnovi preliminarних rezultatov smo se odločili, da bomo ločeno obravnavali proteobakterijska in ostala zaporedja. Obe skupini zaporedij smo poravnali z orodjem Clustal Omega (Sievers in sod., 2011) in izrisali drevo s programom MEGA6 z metodo največjega verjetja in uporabo neparametričnega testa vezanja (*bootstrap*) s 1000 ponovitvami (Sliki 8 in 9).

Rezultati bioinformacijske analize so pokazali, da v rožnatih mikrobnih prevlekah prevladujejo filotipi, ki jih uvrščamo v debela Proteobacteria, Actinobacteria in Acidobacteria. Najpogostejši filotip (22 % zaporedij) je kazal 94-odstotno podobnost z zaporedjem gena za 16S rRNA iz aktinobakterijske vrste *Streptoalloteichus tenebrarius* in morda predstavlja novi rod znotraj družine *Pseudonocardiaceae*. Po zastopanosti so mu sledili filotipi, ki so bili najsorodnejši vrstam *Thiohalomonas denitrificans* (11 % zaporedij), *Provaibacter uvarum* (8 % zaporedij) in *Nitrospira moscoviensis* (7 % zaporedij).

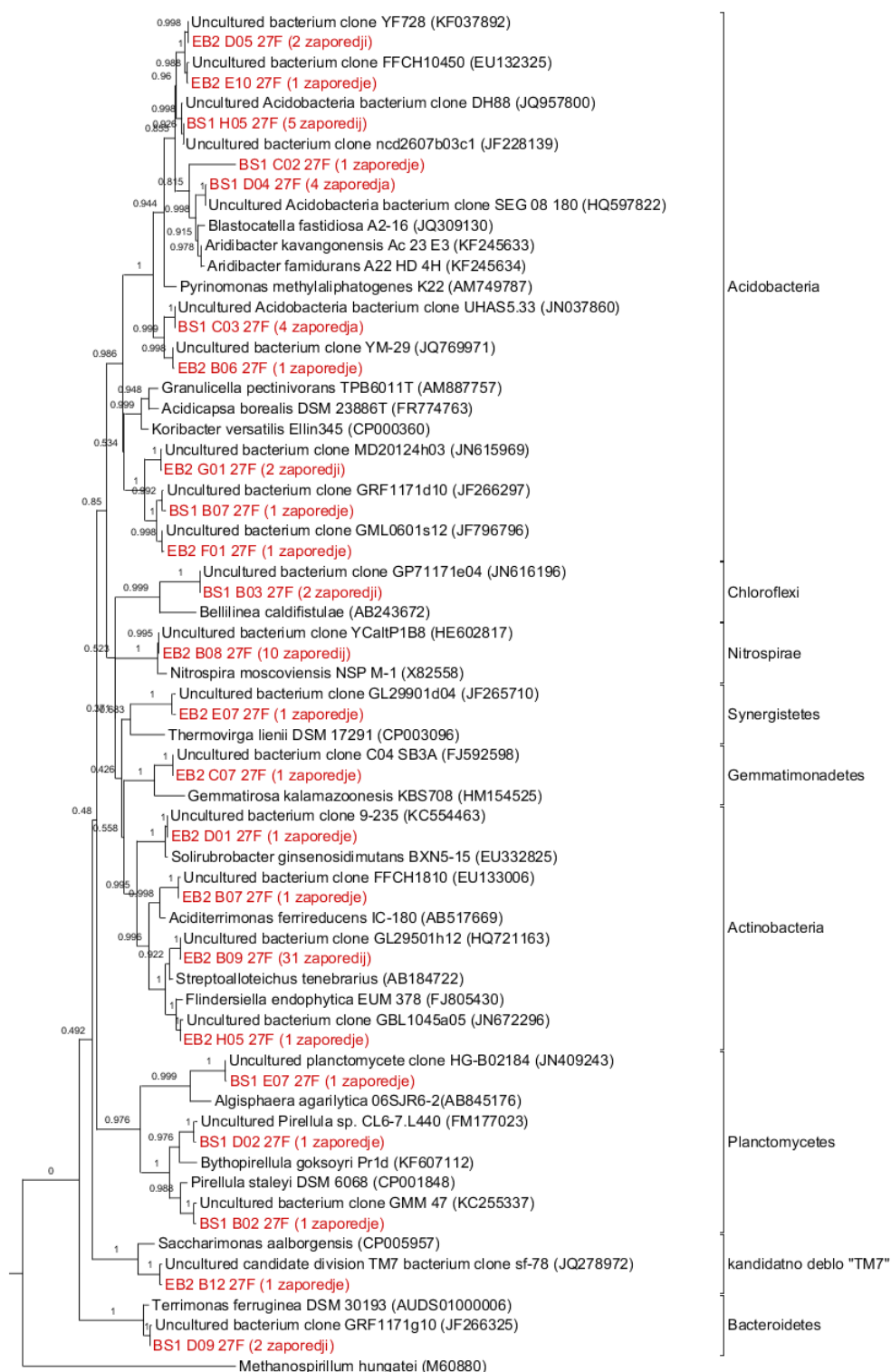
Sestava mikrobne združbe v rožnatih mikrobnih prevlekah jamskega srebra na nivoju debel je podobna sestavi drugih mikrobnih prevlek jamskega srebra iz apnenčastih jam (Pašić in sod., 2010; Porca in sod., 2012), kjer so prav tako ugotovili prevlado bakterij iz debel Proteobacteria in Actinobacteria. Poleg tega so tako kot v naših knjižnicah v manjšem deležu zasledili prisotnost filotipov iz debel Acidobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospirae in Planctomycetes. Filotip EB2_E07_27F (10 zaporedij), ki je soroden bakteriji *Nitrospira moscoviensis*, je bil prisoten tudi v rumenih mikrobnih prevlekah (Porca in sod., 2012). Prav tako je bil v rumenih mikrobnih prevlekah prisoten filotip BS1_F12_27F (15 zaporedij), soroden bakteriji *Thiohalomonas denitrificans*. Preostala dva prevladujoča filotipa sta se grupirala z drugimi karakteriziranimi bakterijskimi vrstami kakor filotipi iz drugih mikrobnih prevlek jamskega srebra (Pašić in sod., 2010; Porca in sod., 2012). Rezultati kažejo na podobnost v sestavi mikrobne združbe rožnatih in rumenih mikrobnih prevlek jamskega srebra na stenah kraških jam na nivoju debela in prevladujočih mikrobnih vrst.

Statistična primerjalna analiza klonskih knjižnic, izdelanih iz rumenih mikrobnih prevlek (Porca in sod., 2012) iz treh različnih kraških jam z orodjema mothur (J-Libshuff) in HOMOVA je pokazala, da gre za mikrobne prevleke s podobno vrstno sestavo. Podobno so pokazali tudi za rožnate in sive mikrobne prevleke (L. Pašić, neobjavljeni rezultati).

Zupančič in sod. (2014) so z orodjem MetametaDB analizirali dostopne klonske knjižnice genov za 16S rRNA jamskega srebra. Pokazali so, da so združbe jamskega srebra najpodobnejše mikrobnim združbam v rizosferi in v tleh. Na nivoju posameznih filotipov so pokazali, da so tudi dominantni filotipi v jamskem srebru najpodobnejši filotipom iz rizosfere in tal, in da je število tovrstnih filotipov majhno (1–5 zadetkov z več kot 97-odstotno enakostjo na nivoju zaporedja gena za 16S rRNA).



Slika 8: Filogenetsko drevo proteobakterijskih genov za 16S rRNA iz rožnatih mikrobnih prevlek iz Pajšarjeve jame in jame Vjetrenica, izrisano z metodo največjega verjetja in z uporabo modela nukleotidnih zamenjav K2 + G + I. Na vejiščih so predstavljene vrednosti podpore *bootstrap*, ki smo jih opredelili z neparametričnim testom samovzorčenja (*bootstrap*) s 1000 ponovitvami. Kot zunanjo skupino smo uporabili bakterijo *Aquifex pyrophilus* (M83548). BS, rožnate mikrobne prevleke iz Pajšarjeve jame; EB, rožnate mikrobne prevleke iz jame Vjetrenica.

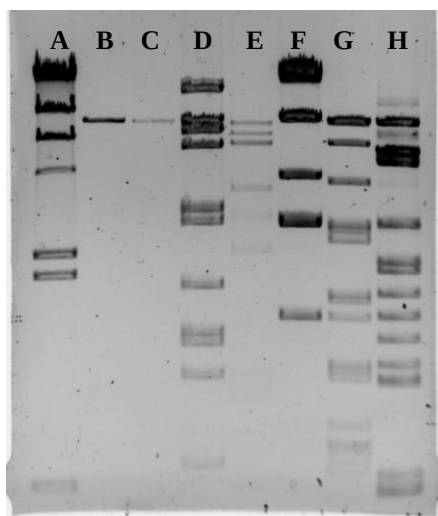


Slika 9: Filogenetsko drevo ne-proteobakterijskih genov za 16S rRNA iz rožnatih mikrobnih prevlek iz Pajsarjeve jame in jame Vjetrenica, izrisano z metodo največjega verjetja in z uporabo modela nukleotidnih zamenjav TN93 + G + I. Na vejiščih so predstavljene vrednosti podpore *bootstrap*, ki smo jih opredelili z neparametričnim testom samovzorčenja (*bootstrap*) s 1000 ponovitvami. Kot zunanjo skupino smo uporabili arhejo *Methanospirillum hungatei* (M60880). BS, rožnate mikrobne prevleke iz Pajsarjeve jame; EB, rožnate mikrobne prevleke iz jame Vjetrenica.

4.3 OCENE KVALITETE FOZMIDNE KNJIŽNICE

Vektor pCC1FOS omogoča zaznavo prisotnosti vključka s pomočjo presejalnega β -galaktozidaznega modro-belega testa. Proizvajalec kompleta »CopyControl™ Fosmid Library Production Kit« (Epicentre, 2012a) zagotavlja, da defosforilacija vektorja popolnoma prepreči njegovo samocirkularizacijo in posledično pojav navidezno pozitivnih klonov na diferencialnem gojišču »LB Cm Ara X-Gal IPTG«. Po drugi strani nekateri avtorji poročajo o zaznavi praznih fozmidnih vektorjev v fozmidnih knjižnicah oz. navidezno pozitivnih klonih (Lucigen Corporation, 2015; Cruz in sod., 2010). S pomočjo modro-belega testa smo želeli opredeliti, ali so v izdelanih fozmidnih knjižnicah prisotni navidezno pozitivni in navidezno negativni kloni.

Na diferencialnih trdnih gojiščih »LB Cm X-gal IPTG« smo pregledali 2.470 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Kontrolni *E. coli* EPI300-T1^R in *E. coli* DH5 α s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka sta tvorili bele kolonije. Zasledili smo 13 beta-galaktozidaza pozitivnih kolonij (razmerje bele kolonije : modre kolonije $\approx$ 189 : 1). Iz petih modrih kolonij smo izolirali fozmidno DNA in ji določili restrikcijski profil (*Eco*RI + *Hind*III). Ugotovili smo, da so kloni vsebovali vektor z vključkom (Slika 10).

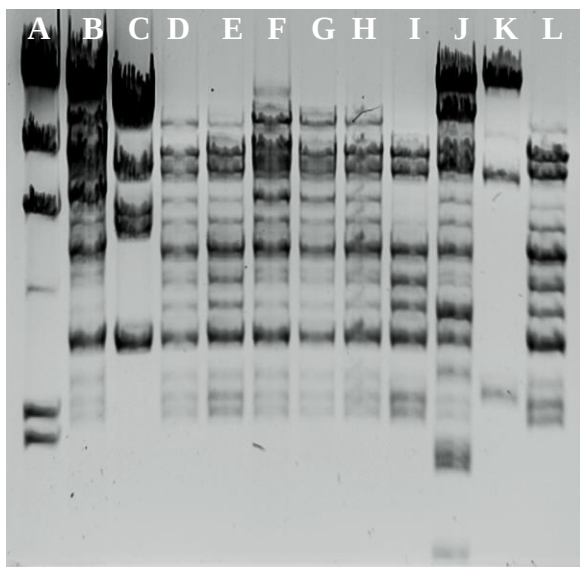


Slika 10: Restrikcijski profil (*Eco*RI + *Hind*III) fozmidne DNA iz navidezno pozitivnih in navidezno negativnih klonov pri modro-belem testu iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. (A) označevalec velikosti λ /*Hind*III, (B) fozmidni vektor pCC1FOS brez vključka (navidezno pozitiven klon), izoliran iz *E. coli* EPI300-T1^R, in lineariziran s *Hind*III, (C) fozmidni vektor pCC1FOS brez vključka (navidezno pozitiven klon), osamljen iz *E. coli* DH5 α , in lineariziran s *Hind*III; (D)–(H) navidezno negativni kloni fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek.

Če fozmidne knjižnice shranjujemo v pomnoženi obliki, jih shranjujemo kot mešano trajno kulturo. Takšno knjižnico pregledujemo tako, da primerno redčene alikvote cepimo na trdna gojišča LB Cm. Ob tem je lahko en klon na plošči zastopan z več kolonijami, kar vpliva na število klonov, ki jih moramo pregledati, da opazimo encimsko aktivnost.

Da bi ocenili število različnih klonov v alikvotih pomnožene fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek, smo 10 μ l alikvote (pet neodvisnih alikvotov) nacepili na

gojišča LB Cm. Naključno smo izbrali 94 klonov, ki smo jih nagojili in jim z alkalno lizo izolirali fozmidno DNA. Fozmidom smo določili restrikcijski profil *EcoRI* + *HindIII* (Slika 11). Zasledili smo 28 različnih restrikcijskih profilov, najpogostejši restrikcijski profil pa se je pojavil kar 66-krat (70 %). Sklepali smo, da okoljska zaporedja v knjižnici iz rožnatih kolonij, ki smo jo po priporočilih proizvajalca shranili kot pomnoženo knjižnico, niso enakomerno zastopana.



Slika 11: Restrikcijski profil (*EcoRI* + *HindIII*) fozmidne DNA iz 11 naključno izbranih klonov iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. (A) označevalec velikosti λ /*HindIII*; (B)–(L) restrikcijski profil 11 naključno izbranih klonov. Razvidni so štirje različni restrikcijski profili; med njimi je najpogostejši restrikcijski profil prisoten pri 8 od 11 pregledanih klonov na sliki.

4.4 OPREDELITEV L-ARABINOZE KOT AVTOINDUKTORJA FOZMIDA pCC1FOS

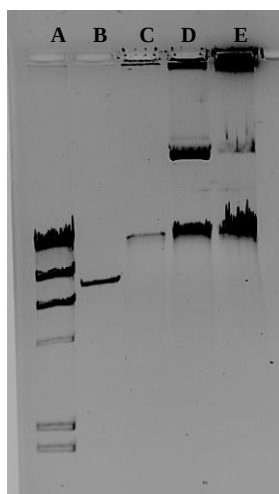
Proizvajalec kompleta »CopyControl™ Fosmid Library Production Kit« (Epicentre, 2012a), ki smo ga uporabili za pripravo fozmidnih knjižnic, v kompletu prilaga komercialno avtoindukcijsko raztopino »Autoinduction Solution«. Raztopina povzroči namnožitev fozmida v več kopij na celico, vendar je spojina, ki deluje kot avtoinduktor, poslovna skrivnost. Ker je v primeru precej podobnih kompletov za pripravo fozmidne knjižnice »CopyRight® v2.0 Fosmid Cloning Kits« konkurenčnega proizvajalca Lucigen Corporation (ZDA) avtoinduktor 0,01-odstotna (w/v) L-arabinoza (Lucigen Corporation, 2015), smo želeli potrditi, ali L-arabinoza deluje kot avtoinduktor tudi pri uporabljenem kompletu proizvajalca Epicentre.

S tem namenom smo klone gojili v 5 ml gojišča LB Cm (12,5 μ g/ml) in z a) 1 $\times$ komercialno avtoindukcijsko raztopino, b) 0,01-odstotno (w/v) L-arabinozo in c) brez induktorja (negativna kontrola). Po končanem gojenju smo iz bakterijske kulture izolirali fozmidno DNA s komercialnim kompletom »QIAprep® Spin Miniprep Kit« (Qiagen) in koncentracijo DNA izmerili spektrofotometrično s spektrofotometrom NanoDrop ND-1000. Rezultati meritev (Preglednica 4) so pokazali, da sta tako 1 $\times$ komercialna avtoindukcijska raztopina »Autoinduction solution« kot tudi 0,01-odstotna (w/v) L-

arabinoza vodili v pribl. 17-kratno povečanje v koncentraciji fozmidne DNA v primerjavi z neinducirano kulturo. Povečanje koncentracije fozmidne DNA ob indukciji smo opazili tudi pri elektroforezni ločitvi fozmidne DNA v 0,6-odstotnem agaroznem gelu, na katerega smo nanесли 1/25 celotne fozmidne DNA, izolirane iz 5 ml prekonočne kulture (Slika 12).

Preglednica 4: Koncentracija fozmidne DNA, ki smo jo s kompletom Miniprep (Qiagen) izolirali iz 5 ml inducirane (komercialna avtoindukcijska raztopina oz. L-arabinoza) in neinducirane prekonočne kulture naključno izbranega klona fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek

Induktor	Koncentracija DNA (ng/μl)
/	14,3
0,01-odstotna (w/v) L-arabinoza	259,1
1 × komercialna avtoindukcijska raztopina	239,7



Slika 12: Elektroforezna ločitev fozmidne DNA iz inducirane in neinducirane naključno izbranega klona fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek v 0,6-odstotnem agaroznem gelu. (A) označevalec velikosti λ /HindIII; (B) lineariziran fozmidni vektor pCC1FOS brez vključka velikosti 8.065 bp; (C) fozmidna DNA iz neinducirane kulture, (D) fozmidna DNA iz kulture, inducirane z 0,01-odstotno L-arabinozo, (E) fozmidna DNA iz kulture, inducirane s komercialno avtoindukcijsko raztopino. Opazimo lahko tri različne konformacije fozmida.

4.5 OPTIMIZACIJA IZOLACIJE FOZMIDNE DNA

Spričo velikosti fozmidnih vektorjev z vključki proizvajalci priporočajo izolacijo fozmidne DNA s komercialnim kompletom. Da bi ugotovili učinkovitost nekomercialnih metod, smo fozmidno DNA izolirali iz 3 ml induciranih prekonočnih kultur na tri različne načine: (a) s komercialnim kompletom »QIAprep Spin Miniprep Kit« (Qiagen), (b) z alkalno lizo in (c) z 1-butanolom. Metoda izolacije z 1-butanolom (Brieger in sod., 2000) je bila neuspešna. Pri tej metodi je bila izolirana DNA najmanj čista (Preglednica 5), prav tako fozmidna DNA v agaroznem gelu v večini primerov ni bila zaznavna. Kot uspešni sta se izkazali metoda alkalne lize ter izolacija s komercialnim kompletom »QIAprep Spin Miniprep Kit« (Qiagen). Povprečna koncentracija in čistost fozmidne DNA, ki smo jo izolirali z zgoraj naštetimi metodami, sta predstavljeni v Preglednici 5. Visoko koncentracijo DNA pri metodi alkalne lize smo pripisali prisotnosti RNA v vzorcu.

Preglednica 5: Povprečna koncentracija in čistost fozmidne DNA, ki smo jo izolirali s tremi različnimi metodami iz 3 ml prekonočne kulture klonov iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek

Metoda izolacije fozmidne DNA	Koncentracija DNA (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
»QIAprep Spin Miniprep Kit«	33,8	1,81	2,03
alkalna liza	2695,2	1,88	2,15
1-butanol	224,5	1,65	1,07

4.6 PRESEJALNI TESTI KLONOV IZ FOZMIDNIH KNJIŽNIC ZA ZAZNAVO HIDROLITIČNE IN ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Fozmidna knjižnica z vključki okoljske DNA, izolirane iz sivih mikrobnih prevlek, je vsebovala 500 klonov. Vsako od napikiranih 5 plošč smo odtisnili na dve plošči LB Cm in vsako od njih nadalje odtisnili na največ pet diferencialnih gojišč za zaznavo protimikrobne/encimske aktivnosti. Tako smo pregledali vseh 500 klonov za 11 različnih preiskovanih aktivnosti. Rezultati presejalnih testov so predstavljeni v Preglednici 6.

Preglednica 6: Rezultati presejalnih testov klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek

Preiskovana hidrolazna/protimikrobna aktivnost	Število pregledanih klonov	Število nepotrjenih pozitivnih klonov	Število potrjenih pozitivnih klonov
amilazna aktivnost (hidroliza škroba)	500	0	0
beta-glukozidazna aktivnost (hidroliza eskulina)	500	0*	0
endoglukanazna aktivnost (hidroliza CMC)	500	0	0
hitinazna aktivnost (hidroliza hitina)	500	0	0
ksilanazna aktivnost (hidroliza ksilana)	500	0	0
lipazna aktivnost (hidroliza tributirina)	500	0	0
proteazna aktivnost (hidroliza lecitina)	500	0	0
protibakterijska aktivnost proti <i>B. subtilis</i>	500	0	0
protibakterijska aktivnost proti <i>E. coli</i> DH5α	500	0	0
protiglivna aktivnost proti <i>S. cerevisiae</i>	500	0	0
spremenjena morfologija ali pigmentacija	(seštevek vseh preostalih testov)	0	0

*pojav beta-glukozidaza pozitivnih mutant po dolgotrajni inkubaciji

Za presejalne teste klonov iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek (70.000 klonov) za encimsko/protimikrobno aktivnost smo iz ene od izhodnih kriovial pomnožene fozmidne knjižnice večkrat odvzeli 10 μl alikvota in jih redčili do titra 300–350 kolonij na ploščo. Za presejalne teste, ki so destruktivni (amilazna, endoglukanazna aktivnost), smo duplikate izhodnih klonov zagotovili z odtisom na žamet in nato na trdna gojišča. Rezultati presejalnih testov za 15 preiskovanih aktivnosti so predstavljeni v Preglednici 7.

V nadaljevanju so predstavljene hidrolazne aktivnosti, ki smo jih tekom pregledovanja fozmidnih knjižnic detektirali na diferencialnih gojiščih, oziroma je bilo potrebno metodo zaznave optimizirati.

Preglednica 7: Rezultati presejalnih testov klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek

Preiskovana hidrolazna/protimikrobna aktivnost	Število pregledanih klonov	Število nepotrjenih pozitivnih klonov	Število potrjenih pozitivnih klonov
amilazna aktivnost (hidroliza škroba)	16.000	0	0
beta-glukozidazna aktivnost (hidroliza eskulina)	83.000	0*	0
endoglukanazna aktivnost (hidroliza CMC)	16.000	1	0
esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza tributirina)	52.000	3	1
esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza detergenta Tween 20)	26.000	0	0
esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza detergenta Tween 80)	3.000	0	0
fosfolipazna/lipazna aktivnost (hidroliza lecitina)	6.000	0	0
hitinazna aktivnost (hidroliza hitina)	5.000	0	0
ksilanazna aktivnost (hidroliza ksilana)	21.000	0	0
lipazna aktivnost (hidroliza olivnega olja)	2.000	0	0
proteazna aktivnost (hidroliza kazeina)	20.000	0	0
protibakterijska aktivnost proti <i>B. subtilis</i>	74.000	0	0
protibakterijska aktivnost proti <i>E. coli</i> DH5α	18.000	0	0
protiglivna aktivnost proti <i>S. cerevisiae</i>	28.000	0	0
spremenjena morfologija ali pigmentacija	(seštevek vseh preostalih testov)	1	0

*pojav beta-glukozidaza pozitivnih mutant po dolgotrajni inkubaciji

4.6.1 Amilazna aktivnost

Za hidrolizo škroba (amilazna aktivnost) smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 16.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

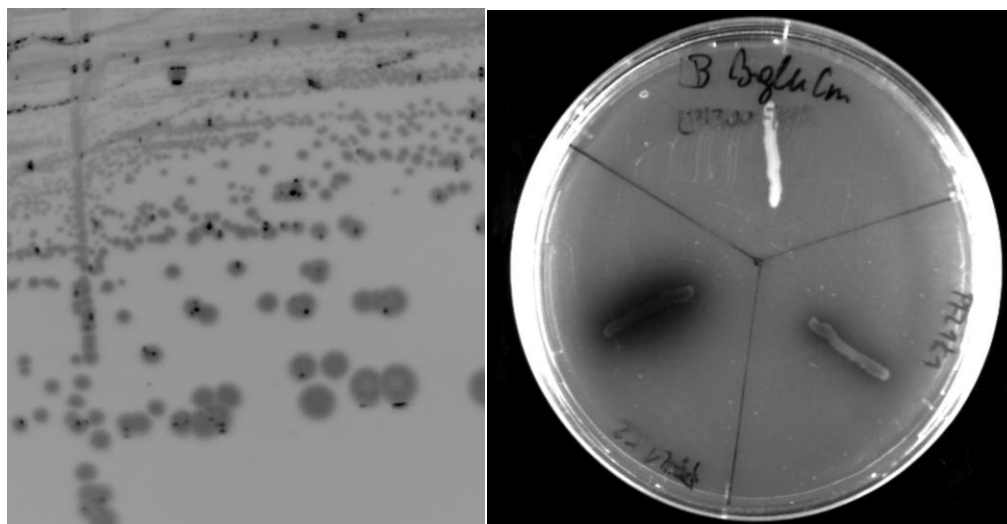
4.6.2 Beta-glukozidazna aktivnost

Beta-glukozidazno aktivnost smo ugotavljali na dveh gojiščih. Na gojišču »LB Cm Ara« z 2,5-odstotnim (w/v) železovim amonijevim citratom in 0,1-odstotnim (w/v) eskulin hidratom smo beta-glukozidazno aktivnost opazili kot rjavo do črno obarvanje okoli pozitivne kontrole (*S. marcescens*). Preizkusili smo tudi gojišče »LB Cm Ara« z 0,05-odstotnim (w/v) železovim citratom in 0,01-odstotnim (w/v) eskulin hidratom (Bergmann, 2014), kjer smo beta-glukozidazno aktivnost opazili kot šibko svetlo rjavo obarvanje okoli pozitivne kontrole. Posledično smo teste izvajali na prvem gojišču. Pregledali smo vseh 500 klonov iz fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 83.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek.

Po tri- ali večdnevni inkubaciji pri 37 °C smo med 83.000 pregledanimi kloni obeh fozmidnih knjižnic opazili 105 klonov, ki so kazali beta-glukozidazno aktivnost. Aktivnost se je pri vseh preiskanih klonih ohranjala pri precepljanju na diferencialno gojišče. Prisotnost vključkov z zapisom za beta-glukozidazo smo preverjali tako, da smo z alkalno

lizo izolirali fozmidno DNA iz 94 beta-glukozidaza pozitivnih klonov in jo cepili z restrikcijskima encimoma *EcoRI* in *HindIII*. Po ločitvi v 0,7-odstotnem agaroznem gelu smo prepoznali 28 različnih restrikcijskih profilov. Deset fozmidov, ki so kazali različne restrikcijske profile, smo z elektroporacijo vnesli v predhodno pripravljene elektrokompetentne celice izogenega seva *E. coli* EPI300-T1^R. Celice smo nacepili na diferencialno gojišče za zaznavo beta-glukozidazne aktivnosti. Tako pripravljene transformante niso izkazovale beta-glukozidazne aktivnosti. Sklepali smo, da fozmidni vključki ne vsebujejo beta-glukozidaznih genov.

V nadaljevanju smo preverili, ali je beta-glukozidazna aktivnost posledica izražanja enega od kriptičnih beta-glukozidaznih operonov pri *E. coli*. V ta namen smo beta-glukozidaza pozitivnim klonom izbili fozmid z elektroporacijo po modificiranem protokolu, ki so ga opisali Heery in sod. (1989). Uspešnost izbitja fozmida je bila 1 : 100 (eden od testiranih 100 klonov ni bil odporen proti kloramfenikolu). Odsotnost fozmidne DNA iz klona z izbitim fozmidom smo potrdili z izolacijo fozmidne DNA z metodo alkalne lize; na agaroznem gelu po elektroforezni ločitvi nismo zasledili DNA. Kljub odsotnosti fozmidnega vektorja je klon izkazoval beta-glukozidazno aktivnost na diferencialnem gojišču. Predvidevali smo, da je razlog aktivacija enega od kriptičnih beta-glukozidaznih operonov. Da bi to preverili, smo seva *E. coli* DH5 α in *E. coli* EPI300-T1^R brez fozmida cepili na diferencialno gojišče. Tudi pri teh sevih smo po 3–5-dnevni inkubaciji pri 37 °C opazili pojav beta-glukozidaza pozitivnih (temnih) mutant na že obstoječih zraslih (belih) kolonijah *E. coli* (t. i. papile) (Slika 13). Deset papil smo precepili tudi do posamezne beta-glukozidaza pozitivne kolonije in ponovljivost aktivnosti pokazali z večkratnim zaporednim precepljanjem na diferencialno gojišče.



Slika 13: Pojav črnih (beta-glukozidaza pozitivnih) papil na belih (beta-glukozidaza negativnih) kolonijah po štiridnevni inkubaciji indikatorskih gojišč pri 37 °C (levo). Papile so ob ponovni nacepitvi na diferencialno gojišče stabilno izkazovale beta-glukozidazno aktivnost po enodnevni inkubaciji gojišč pri 37 °C, medtem ko gostiteljski sev EPI300-T1^R s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka (zgoraj) ni izkazoval beta-glukozidazne aktivnosti (desno).

4.6.3 Endoglukanazna aktivnost (hidroliza CMC)

Endoglukanazno aktivnost smo spremljali na gojiščih LB z dodano CMC. Prisotnost aktivnosti pri pozitivni kontroli *Cellulomonas uda* DSM20108 smo opredelili na dva načina: (a) z barvanjem gojišč z 0,2-odstotno (w/v) raztopino kongo rdečega (Liu in sod., 2011) in (b) z barvanjem gojišč z lugolom (Kasana in sod., 2008). Pri barvanju plošč s kongo rdečim smo aktivnost opazili kot rumeno razbarvanje okoli pozitivne kontrole na rdečem ozadju, medtem ko smo pri barvanju z lugolom le stežka opazili razbarvanje okoli pozitivne kontrole na šibko vijolično obarvanem ozadju. V nadaljevanju smo zato gojišča barvali s kongo rdečim.

Za hidrolizo CMC (endoglukozidazna aktivnost) smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 16.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Zasledili smo en domnevno pozitiven klon fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek, ki ni stabilno izkazoval endoglukanazne aktivnosti ob ponovni nacepiti na diferencialno gojišče za zaznavo endoglukanazne aktivnosti.

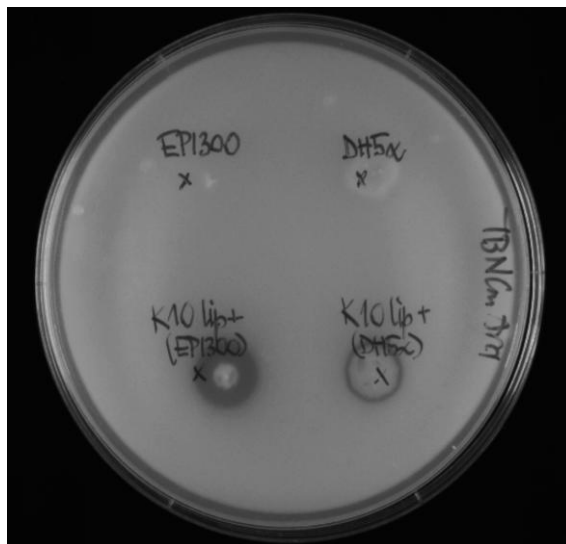
4.6.4 Esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza tributirina)

Za iskanje klonov z lipazno/esterazno aktivnostjo smo vse preiskovane klone sprva nacepili na gojišče LB z 1-odstotnim tributirinom. Pozitivne klone smo nadalje nacepili na naslednja diferencialna trdna gojišča: (a) LB z jajčnim rumenjkom (fosfolipazna/lipazna aktivnost), (b) LB z 1-odstotnim olivnim oljem (lipazna aktivnost), (c) LB z 1-odstotnim detergentom Tween 20 (esterazna/lipazna aktivnost) in (d) LB z 1-odstotnim detergentom Tween 80 (esterazna/lipazna aktivnost).

Za hidrolizo tributirina (lipolitična aktivnost) smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 52.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. V knjižnici iz sivih mikrobnih prevlek pozitivnih klonov nismo zaznali. V fozmidni knjižnici iz rožnatih mikrobnih prevlek smo zasledili tri pozitivne klone, od katerih je eden stabilno izkazoval esterazno/lipazno aktivnost ob vnovični nacepiti na gojišče s tributirinom. Klon smo poimenovali K10 lip+. Iz domnevno pozitivnega klona smo izolirali fozmidno DNA in jo z elektroporacijo vnesli v izogeni sev *E. coli* EPI300-T1^R. Klon je na diferencialnem gojišču stabilno izražal aktivnost tudi po elektroporaciji. Fozmid iz klona K10 lip+ smo z elektroporacijo vnesli tudi v sev *E. coli* DH5 α , kjer je bila cona zbistritve na gojišču s tributirinom prav tako prisotna, vendar manjša (Slika 14). Klon K10 lip+ ni izkazoval aktivnosti pri nobenem od drugih presejalnih testov za esterazno/lipazno/fosfolipazno aktivnost (hidroliza detergentov Tween 20 in Tween 80, hidroliza olivnega olja, hidroliza lecitina).

Pri obeh gostiteljskih sevih *E. coli* (EPI300-T1^R in DH5 α) smo po dolgotrajni inkubaciji (več kot trodnevna inkubacija plošč pri 37 °C ali več kot enotedenska inkubacija gojišč pri 4 °C) opazili hidrolitično aktivnost gostiteljskega seva *E. coli* EPI300-T1^R s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka (ang. *background activity*), ki je oteževala zaznavo pozitivnih klonov.

Preiskovane hidrolaze s peptidazno, lipazno ali glikolitično aktivnostjo lahko izkazujejo tudi protimikrobno aktivnost (Iqbal in sod., 2014), zato smo klon K10 lip⁺ testirali tudi za protimikrobno aktivnost proti *B. subtilis*, *E. coli* DH5 α in *S. cerevisiae*, kot je opisano v poglavju 3.7. Klon ni kazal protimikrobne aktivnosti proti nobenemu od testiranih sevov.



Slika 14: Potrjen klon K10 lip⁺ iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek z lipolitično aktivnostjo na gojišču s tributirinom. Zgoraj: gostiteljska seva *E. coli* EPI300-T1^R in DH5 α (negativni kontroli). Spodaj: Pozitivna klon K10 lip⁺ EPI300-T1^R in DH5 α . Pri obeh gostiteljskih sevih *E. coli* je opazna cona zbistritve (cona hidrolize) okoli klona K10 lip⁺.

Izoliranemu fozmidu iz klona K10 lip⁺ so v podjetju Macrogen (Južna Koreja) določili tudi nukleotidno zaporedje enega od koncev vključka, ki meji na promotor T7. Nukleotidnemu zaporedju smo poiskali najpodobnejše zaporedje znotraj podatkovne zbirke »GenBank nr« z algoritmom BlastX kot tudi prevedli nukleotidno zaporedje v vseh šestih bralnih okvirjih in poiskali najpodobnejša zaporedja z algoritmom BlastP. Zaporedje je imelo največjo podobnost (30-odstotna podobnost, 78-odstotna pokritost, E-vrednost 5×10^{-45}) s transkripcijskim regulatorjem družine GntR z domeno MACPF (ang. *Membrane Attack Complex/Perforin*) iz bakterije *Sporocytophaga myxococcoides* (dostopna številka 780084028). Natančna taksonomska opredelitev, določitev celotnega zaporedja vključka ter biokemijska potrditev in opis domnevne lipaze iz klona K10 lip⁺ so predmet prihodnjih raziskav.

4.6.5 Esterazna/lipazna aktivnost (hidroliza detergentov Tween 20 in Tween 80)

Za hidrolizo detergenta Tween 20 smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 26.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali. Za hidrolizo detergenta Tween 80 (lipolitična aktivnost) smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 3.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

Pri obeh gostiteljskih sevih *E. coli* (EPI300-T1^R in DH5 α) smo po dolgotrajni inkubaciji (več kot dvodnevna inkubacija gojišč pri 37 °C ali več kot enotedenska inkubacija gojišč

pri 4 °C) opazili hidrolizo detergentov Tween 20 in Tween 80, ki je oteževala zaznavo pozitivnih klonov (Slika 15).



Slika 15: Esterazna aktivnost samega gostiteljskega seva EPI300-T1^R na gojišču z 1-odstotnim detergentom Tween 20 po dvodnevni inkubaciji pri 37 °C. Esterazna aktivnost (cona bele prašnate oborine okoli kolonije) se kaže tako okoli gostiteljskega seva EPI300-T1^R s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka (na sliki označen kot NK) kot tudi okoli kolonij petih naključno izbranih klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek.

4.6.6 Lipazna aktivnost (hidroliza olivnega olja)

Hidrolizo olivnega olja smo spremljali na dveh gojiščih: (a) kromogeno trdno gojišče LB z 1-odstotnim olivnim oljem, 0,1-odstotnim fenol rdečim in 10 mM CaCl₂ in (b) kromogeno trdno gojišče z 1-odstotnim olivnim oljem, 0,1-odstotnim fenol rdečim in 10 mM CaCl₂, ki ni vsebovalo gojišča LB (Rajan in sod., 2011).

Na kromogenem trdnem gojišču LB z 1-odstotnim olivnim oljem, 0,1-odstotnim fenol rdečim in 10 mM CaCl₂ nismo opazili lipolitične aktivnosti. Po dvodnevni inkubaciji gojišč pri 37 °C kot tudi po nadaljnji 3–5-dnevni inkubaciji trdnih gojišč pri 4 °C se je gojišče okoli pozitivne (*P. aeruginosa* PAO1) in negativne (*E. coli* EPI300-T1^R) kontrole obarvalo ciklama do vijolično, kar kaže na dvig pH v gojišču. Okoli kolonije *P. aeruginosa* PAO1 smo opazili majhno cono zbistritve in cono bele oborine, ki sta verjetno posledica lipolitične aktivnosti.

Iz prekonočnih kultur pozitivne in negativne kontrole smo pripravili tudi filtriran supernatant (premer por filtra 0,22 µm) in po 50 µl supernatanta odpipetirali na sterilne papirnate diske, ki smo jih nanесли na kromogeno gojišče za zaznavo lipazne aktivnosti. Tudi ta metoda ni bila uspešna, saj se je vrednost pH gojišča hipoma dvignila tako v primeru negativne (*E. coli* EPI300-T1^R) kot tudi pozitivne kontrole (*P. aeruginosa*). Barva gojišča se je iz rdeče spremenila v ciklamno rdečo do vijolično barvo. Dodatek sterilnega gojišča LB kromogenemu gojišču ni povzročil spremembe v obarvanju gojišča. Neuspešna je bila tudi zaznava lipazne aktivnosti v supernatantu prekonočne kulture *P. aeruginosa* na trdnem kromogenem gojišču brez dodatka gojišča LB.

Za hidrolizo olivnega olja (lipazna aktivnost) smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 2.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

4.6.7 Hitinazna aktivnost (hidroliza koloidnega hitina)

Za hidrolizo koloidnega hitina (hitinazna aktivnost) smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 5.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

4.6.8 Ksilanazna aktivnost (hidroliza ksilana)

Ksilanazni aktivnosti običajno sledimo tako, da diferencialno gojišče (gojišče LB z dodanim ksilanom) obarvamo z 0,2-odstotno (w/v) raztopino kongo rdečega (Liu in sod., 2011). Ta metoda v našem primeru ni bila uspešna. Ksilanazna aktivnost se je okoli pozitivne kontrole (*C. uda* DSM20108) kazala kot cona razbarvanja okoli ksilanaza pozitivne kolonije tudi brez barvanja z raztopino kongo rdečega. Predvidevamo, da je do razbarvanja prišlo zaradi uporabe bukovega ksilana (Sigma-Aldrich), medtem ko se običajno kot dodatek h gojišču uporablja brezov ksilan.

Za hidrolizo ksilana (ksilanazna aktivnost) smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 21.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

4.6.9 Protibakterijska aktivnost proti *E. coli*

Protibakterijsko aktivnost proti *E. coli* smo preverjali tako, da smo testirane klone nacepili na plošče in prelili z mehkim agarjem, v katerega smo vmešali alikvot prekonočne kulture *E. coli* DH5 α pTV24 (Cm^R). Slednjega smo pripravili tako, da smo iz seva *E. coli* DH1 z alkalno lizo izolirali plazmid pTV24 (Cm^R) in ga z elektroporacijo vnesli v pripravljene elektrokompetentne celice *E. coli* DH5 α . Po 200 μ l prekonočne kulture *E. coli* DH5 α pTV24 (Cm^R) smo vmešali v 3,5 ml mehkega agarja LB, z mehkim agarjem prelili plošče in rezultate opredelili po eno- do dvodnevni inkubaciji gojišč pri 37 °C.

Za protimikrobno aktivnost proti *E. coli* smo pregledali vseh 500 klonov iz fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 18.000 klonov iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

4.6.10 Protibakterijska aktivnost proti *B. subtilis*

Da bi učinkovito spremljali protibakterijsko aktivnost, smo primerjali tri različne metode:

- 200 μ l prekonočne kulture smo vmešali v 3,5 ml mehkega agarja LB, z mehkim agarjem prelili plošče in rezultate opredelili po eno- do dvodnevni inkubaciji gojišč pri 37 °C,
- 350 μ l kulture z OD₆₀₀ = 0,2–0,3 smo vmešali v 3,5 ml mehkega agarja LB (nekoliko modificirana metoda, opisana v Rondon in sod., 2000); z mehkim agarjem prelili plošče in rezultate opredelili po eno- do dvodnevni inkubaciji gojišč pri 37 °C,
- 17,5 μ l kulture z OD₆₀₀ = 0,5 smo vmešali v 3,5 ml mehkega agarja LB (nekoliko modificirana metoda, opisana v Brady in sod., 2007), z mehkim agarjem prelili plošče in rezultate opredelili po eno- do dvodnevni inkubaciji gojišč pri 30 °C.

Najbolj uspešna je bila metoda (1), pri kateri je bila prerast gojišč z bakterijo *B. subtilis* najboljša, zato smo jo uporabili kot presejalni test za zaznavo protibakterijske aktivnosti proti *B. subtilis*. Metodi (2) in (3) sta rezultirali v slabši rasti bakterije *B. subtilis*; gojišča po enodnevni inkubaciji pogosto niso bila dovolj motna za zaznavo morebitnih con inhibicije rasti. Kot pozitivni kontroli za zaznavo protibakterijske aktivnosti proti *B. subtilis* smo uporabili bakteriji *S. marcescens* in *P. aeruginosa*.

Za protimikrobno aktivnost proti *B. subtilis* smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice sivih mikrobnih prevlek in 74.000 klonov fozmidne knjižnice rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

Pri gostiteljskem sevu *E. coli* EPI300-T1^R s fozmidnim vektorjem pCC1FOS brez vključka (negativna kontrola) smo v nekaj primerih opazili šibko protibakterijsko aktivnost proti *B. subtilis*, ki je oteževala zaznavo pozitivnih klonov.

4.6.11 Protiglivna aktivnost proti *S. cerevisiae*

Primerjali smo tri različne metode za zaznavo protiglivne aktivnosti proti kvasovki *S. cerevisiae*. Metode temeljijo na prelivanju testiranih klonov z mehkim agarjem, v katerega smo vmešali alikvot prekonočne kulture *S. cerevisiae* kot sledi:

- po 200 µl prekonočne kulture smo vmešali v 3,5 ml mehkega agarja YPD, z mehkim agarjem prelili plošče in rezultate opredelili po eno- do dvodnevni inkubaciji gojišč pri 30 °C,
- po 200 µl prekonočne kulture smo vmešali v 5 ml mehkega agarja YPD, z agarjem prelili plošče in rezultate opredelili po eno- do dvodnevni inkubaciji gojišč pri 30 °C in
- po 350 µl kulture z OD₆₀₀ = 0,2–0,3 smo vmešali v 3,5 ml mehkega agarja LB (nekoliko modificirana metoda, opisana v Chung in sod., 2008), z agarjem prelili plošče in rezultate opredelili po eno- do dvodnevni inkubaciji gojišč pri 30 °C.

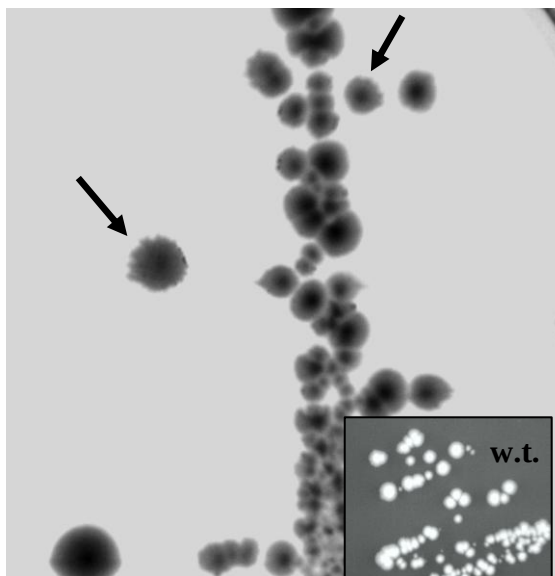
Najbolj uspešna je bila metoda (2), pri kateri smo opazili najboljšo prerast gojišča s kvasovko *S. cerevisiae*, zato smo jo uporabili kot presejalni test za zaznavo protiglivne aktivnosti. V primeru manjšega uporabljenega volumna (3,5 ml) mehkega agarja YPD (metoda 1) je bila prerast gojišča s kvasovko *S. cerevisiae* precej slabša. Metoda (3) je rezultirala v skoraj nezaznavni prerasti gojišč po enodnevni inkubaciji pri 30 °C. Kot pozitivno kontrolo za zaznavo protiglivne aktivnosti smo uporabili bakteriji *S. marcescens* in *P. aeruginosa*.

Za protimikrobno aktivnost proti *S. cerevisiae* smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 28.000 klonov fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Pozitivnih klonov nismo zaznali.

4.6.12 Spremenjena morfologija ali pigmentacija

Za spremenjeno morfologijo ali pigmentacijo smo pregledali vseh 500 klonov fozmidne knjižnice iz sivih mikrobnih prevlek in 370.000 klonov (seštevek vseh ostalih presejalnih testov) fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. V knjižnici iz sivih mikrobnih prevlek pozitivnih klonov nismo zaznali. V fozmidni knjižnici iz rožnatih mikrobnih

prevlek smo zasledili en klon, katerega kolonije so imele valovit rob (Slika 16). Ob ponovni nacepiti na trdno gojišče LB Cm Ara ali LB Cm klon ni stabilno izkazoval spremenjene morfologije in ga nismo uspeli potrditi z elektroporacijo fozmida v izogeni sev.



Slika 16: Fotografija kolonij klona z domnevno spremenjeno morfologijo iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek, ki ga nismo uspeli potrditi z vnosom fozmida v izogeni sev. S puščico so označene kolonije, ki so izkazovale spremenjeno morfologijo na trdnem gojišču LB Cm Ara. w.t., divji tip.

4.7 EMPIRIČNA OPREDELITEV NAPORA PREGLEDOVANJA METAGENOMSKE KNJIŽNICE

4.7.1 Vpliv velikosti prokariontskih genomov v vzorcu na napor pregledovanja

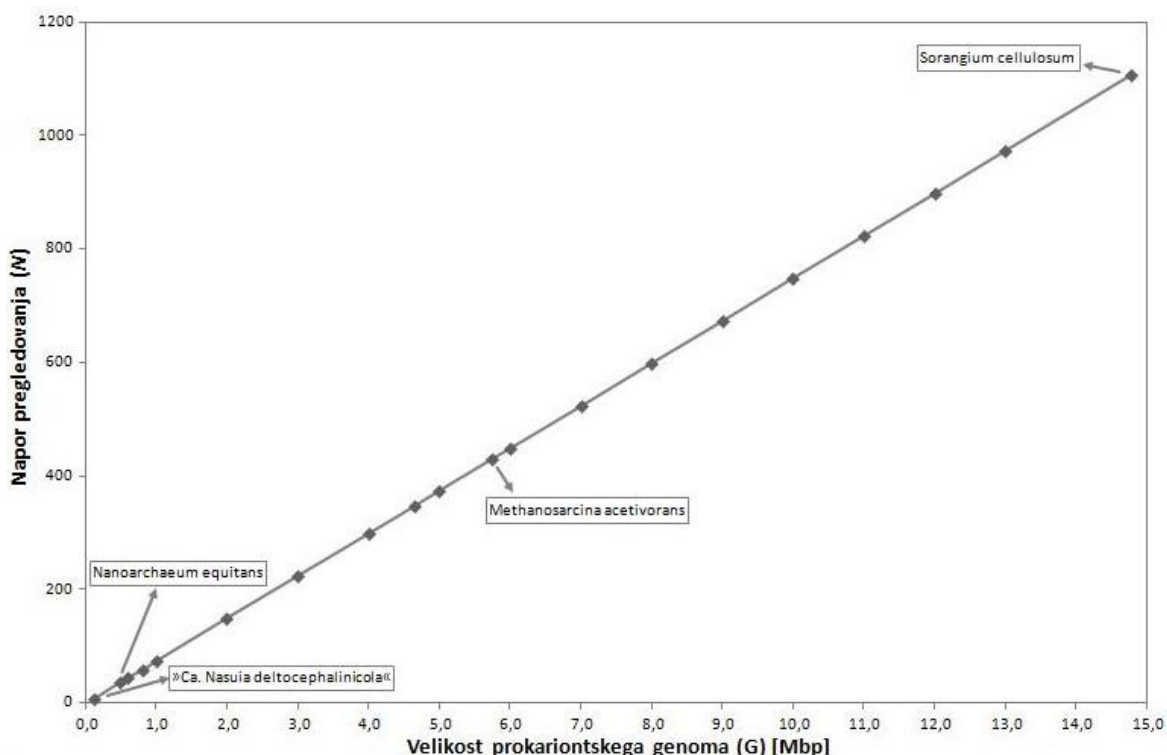
Enačba (1), s katero opredelimo napor pregledovanja knjižnice, upošteva velikost vključka in velikost matričnega genoma:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)} \quad \dots(1),$$

kjer N predstavlja minimalno število klonov, ki jih je potrebno pregledati, P predstavlja verjetnost, da je preiskovano intaktno zaporedje prisotno pri vsaj enem izmed vseh pregledanih klonov, f je delež velikosti celotnega genoma, ki ga predstavlja vključek ($f = \text{dolžina vključka} / \text{velikost genoma}$) (Kim in sod., 2008). Napor pregledovanja (N) je tako linearno odvisen od velikosti prokariontskega genoma (Slika 17).

V primeru metagenomskih fozmidnih knjižnic lahko koeficient f izračunamo tako, da upoštevamo povprečni velikosti vključka (40 kbp) in prokariontskih genomov. V času izdelave magistrske naloge je povprečna velikost bakterijskih genomov znašala $3.369.858 \pm 181.999$ bp ($N = 3.417$), medtem ko je povprečna velikost arhejskih genomov znašala $2.227.811 \pm 728.018$ bp ($N = 180$). Največji bakterijski genom (*Sorangium cellulosum* So0157-2, 14.782.125 bp) je 132-krat večji od najmanjšega (*Candidatus Nasuia*

deltoccephalinicola« str. NAS-ALF, 112.091 bp). Največji arhejski genom (*Methanosarcina acetivorans* C2A, 5.751.492 bp) je le 12-krat večji od najmanjšega (*Nanoarchaeum equitans* Kin4-M, 490.885 bp). Sklepamo, da bi morali v genomske knjižnice iz bakterijskega seva z največjim genom pregledati najmanj 163-krat več klonov ($N = 1.105$) kot v genomske knjižnici seva z najmanjšim genomom ($N = 7$), da bi v njej s 95-odstotno verjetnostjo našli intaktno preiskovano zaporedje dolžine 40 kbp. V primeru arhejskih genomov je ta razlika približno 12-kratna ($N_{\max}/N_{\min} = 429/35$) (Slika 17).



Slika 17: Odvisnost napora pregledovanja (N) od velikosti prokariotskega genoma (Mbp). Napor pregledovanja smo izračunali po enačbi (1) z upoštevanjem 95-odstotne verjetnosti (P) in velikosti vključka 40 kb. Na sliki so označeni najmanjši in največji do danes znani arhejski in bakterijski genomi.

4.7.2 Vpliv velikosti preiskovanih fragmentov na napor pregledovanja

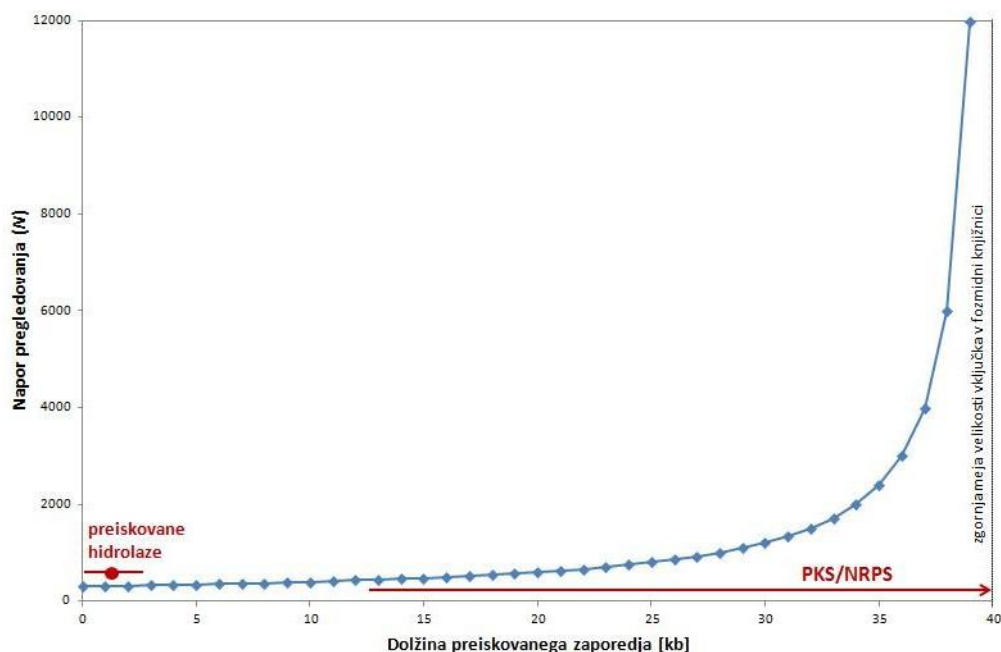
Enačba (1) velja le v primeru, ko je dolžina iskanega zaporedja zanemarljivo majhna v primerjavi z velikostjo celotnega vključka. V primeru iskanja dolgih nukleotidnih zaporedij (npr. celotnih biosinteznih poti) je potrebno enačbo (1) popraviti s koeficientom c , ki določa verjetnost, da vključek vsebuje intaktno preiskovano zaporedje:

$$c = \frac{I - B + 1}{I} \quad \dots(2),$$

kjer je B dolžina preiskovanega zaporedja, I je dolžina vključka. Tako dobimo s koeficientom c popravljeno enačbo (1) (Kim in sod., 2008):

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - (c \times f))} \quad \dots(3).$$

Odvisnost napora pregledovanja (N) od velikosti iskanega fragmenta je tako eksponencialna (Slika 18).



Slika 18: Odvisnost napora pregledovanja (N) od dolžine zaporedja, na katerem je iskana lastnost zapisana (kbp). Napor pregledovanja smo izračunali po enačbi (3) z upoštevanjem 95-odstotne verjetnosti (P), da je iskano zaporedje v celoti prisotno pri vsaj enem izmed pregledanih klonov, upoštevanjem velikosti vključka (I) 40 kb in velikosti genoma (G) 4,0 Mbp. Na sliki sta predstavljeni tudi ocenjena povprečna velikost genov za preučevane hidrolaze in običajna velikost genskih gručk NRPS/PKS.

Opazimo lahko, da bi morali zaradi pristranskosti dolžine gena za preučevane hidrolaze (povprečna dolžina 1.656 ± 807 bp) pregledati zanemarljivo (1,04-krat oz. 4 %) več klonov kakor pri iskanju zaporedja z zanemarljivo majhno velikostjo, kar pa ne velja za zaporedja velikosti ≥ 10 kbp, kakršne so gruče genov NRPS/PKS (Slika 18, Priloga S). Tako moramo npr. v primeru iskanja zaporedja z velikostjo 30 kbp zaradi pristranskosti dolžine preiskovanega zaporedja pregledati 4-krat večje število klonov kot v primeru zanemarljivo majhnega zaporedja (Preglednica 8).

Preglednica 8: Primer izračuna vpliva dolžine gena za preiskovane hidrolaze na napredovanje. Napor pregledovanja smo izračunali iz enačb (1) in (3). B , dolžina preiskovanega zaporedja; G , velikost genoma; I , velikost vključka; P , verjetnost, da je intaktno preiskovano zaporedje prisotno pri vsaj enem izmed klonov; c , koeficient c ; N , minimalno število klonov, ki jih moramo pregledati.

B [bp]	G [Mbp]	I [kbp]	P	f	c	N_1 (brez upoštevanja c)	N_2 (z upoštevanjem c)	razmerje N_2/N_1
1	4,0	40,0	0,95	0,1	1,00	298	298	1,00
1260	4,0	40,0	0,95	0,1	0,96	298	311	1,04
12500	4,0	40,0	0,95	0,1	0,69	298	434	1,46
30000	4,0	40,0	0,95	0,1	0,25	298	1197	4,01

4.8 ANALIZA METAGENOMA »ECHO PASSAGE«

»Echo Passage« je metagenom treh kapnikov v jamskem sistemu »Kartchner caverns« (Arizona). Gre za edini metagenom kraških jam, objavljen v času izdelave magistrskega

dela, in tako najboljši približek preiskovanim jamam (Ortiz in sod., 2014). Metagenom »Echo Passage Metagenome« je objavljen na spletnem orodju IMG/M (Markowitz in sod., 2013) pod dostopno številko »IMG-ID 2189573024«. Vključuje 409.543 nukleotidnih zaporedij (združenih odčitkov, ang. *contigs*), ki so jih anotirali z orodjem »IMG/M ER«. Orodje je 363.306 zaporedij identificiralo kot gene, ki kodirajo proteine, in jih prevedlo v aminokislinska zaporedja.

4.8.1 Taksonomska analiza metagenoma »Echo Passage«

Taksonomsko sestavo metagenoma »Echo Passage« smo opredelili na nivoju domen z orodji IMG/M, MG-RAST, AMPHORA in NBC Classifier. V vseh štirih primerih smo kot vhodno datoteko uporabili sestavljena metagenomska zaporedja. Taksonomska sestava metagenoma na nivoju domen je povzeta v Sliki 19.

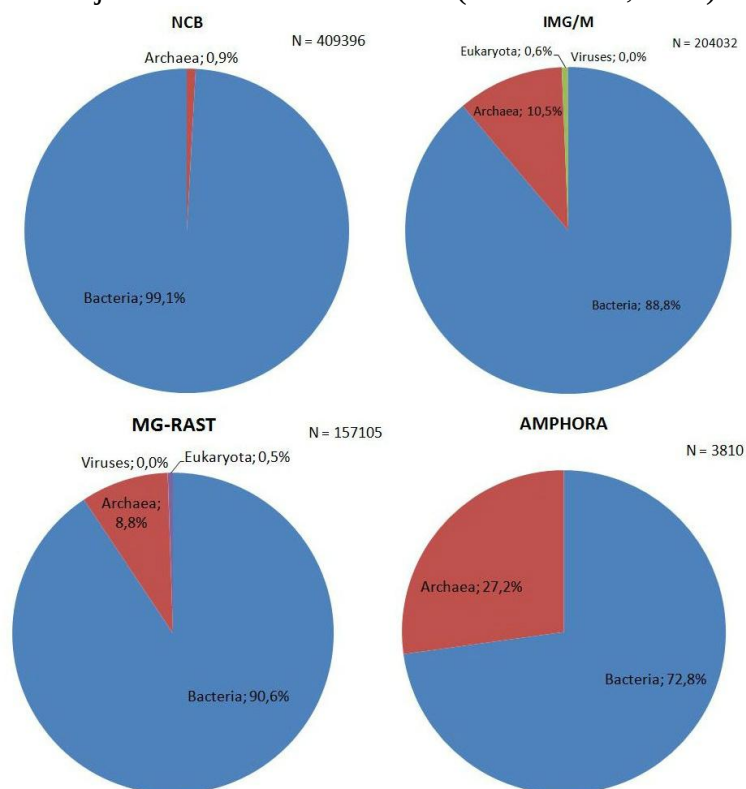
Z orodjem **NBC Classifier** smo filogenijo na podlagi k -merov ($k = 15$) določili vsem metagenomskim zaporedjem ($N = 409.396$). Pri tem smo kot referenčno podatkovno zbirko izbrali prokariotsko podatkovno zbirko NCB. Rezultati NBC kažejo na veliko prevlado bakterij (99,1 %) v primerjavi z arhejami (0,9 %).

Z avtomatiziranimi orodjema **IMG/M** in **MG-RAST** smo filogenijo pripisali vsem zaporedjem, ki sta jih orodji lahko zanesljivo filogenetsko opredelili na podlagi podobnosti z zaporedji v svojih podatkovnih zbirkah (orodji najpodobnejša zaporedja v osnovi identificirata z algoritmom BLAST oz. BLAT). IMG/M je filogenijo pripisal 204.032 zaporedjem, medtem ko je MG-RAST filogenijo pripisal 157.105 zaporedjem. Orodji sta taksonomsko sestavo metagenoma opredelili podobno in ocenili, da so bakterije zastopane v 88,8–90,6 %, medtem ko so arheje zastopane v 8,8–10,5 %.

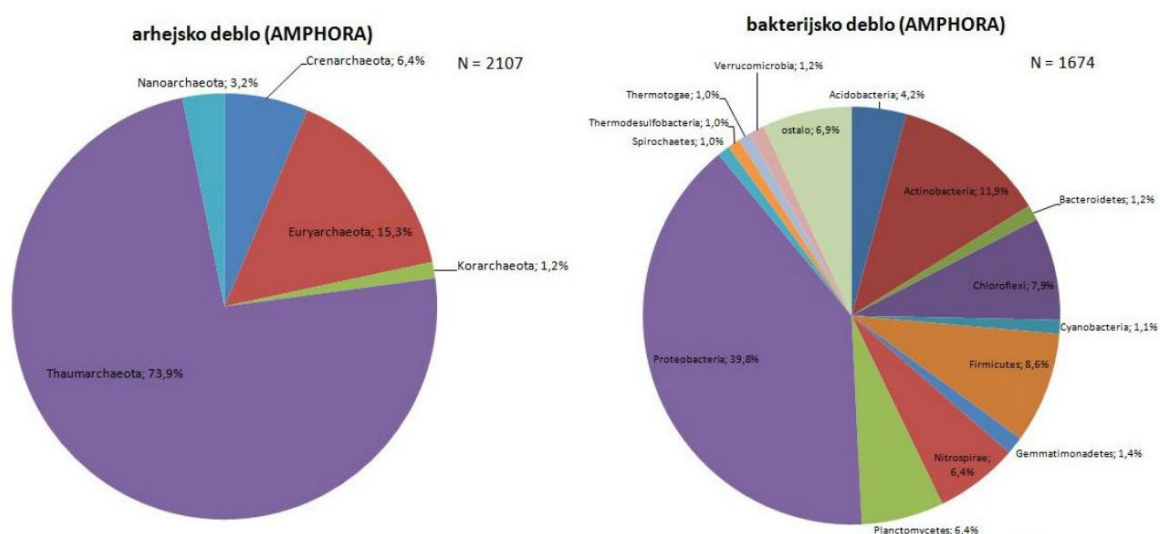
Z orodjem **AMPHORA2**, ki sestavo opredeli na osnovi filogenetskih označevalcev, smo identificirali 3810 metagenomskih zaporedij, od tega 2.118 arhejskih in 1.692 bakterijskih. Zastopanost bakterij in arhej v metagenomu smo normalizirali na število označevalskih družin genov v podatkovni zbirki AMPHORA za posamezno deblo (104 arhejskih in 31 bakterijskih družin genov) in ugotovili, da večino (72,8 %) označevalskih zaporedij lahko uvrstimo v domeno Bacteria. Orodje je ocenilo, da arheje predstavljajo približno četrtino (27,2 %) vseh prokariotov v metagenomu »Echo Passage«.

Rezultati kažejo na veliko odstopanje v ocenjeni zastopanosti različnih domen v metagenomu. Ker uporabljena orodja za taksonomski pripis uporabljajo različne algoritme (glej Sliko 2), različen nabor analiziranih zaporedij in različne referenčne podatkovne zbirke, je rezultate težko primerjati. Klasifikacijska orodja, ki temeljijo na filogeniji, veljajo za najbolj zanesljiva, zato smo se odločili, da bomo taksonomsko sestavo metagenoma do nivoja debela natančno opredelili z orodjem AMPHORA2 (Slika 20). Rezultati kažejo, da med bakterijami prevladujejo predstavniki Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes in Chloroflexi, medtem ko med arhejami močno (73,9 %) prevladujejo predstavniki Thaumarchaeota (v nadaljevanju: taumarheje). Prevlado taumarhej smo opazili tudi pri analizi metagenoma z MG-RAST in IMG/M, medtem ko je orodje NCB za prevladujoče arhejsko deblo ocenilo evriarheje (podatki niso prikazani).

Naši rezultati taksonomske sestave metagenoma na nivoju debela, opredeljene z orodjem AMPHORA2 (Slika 20), so v skladu z rezultati Ortiz in sod. (2013), ki so poročali, da v jami »Kartchner caverns« prevladujejo heterotrofne bakterije iz debel Proteobacteria, Acidobacteria in Actinobacteria. Prav tako so v skladu s primarno analizo metagenoma »Echo Passage« na osnovi podobnosti (MG-RAST), ki je pokazala, da v metagenomu »Echo Passage« prevladujejo bakterije iz debel Proteobacteria, Actinobacteria in Planctomycetes ter arheje iz debela Thaumarchaeota (Ortiz in sod., 2014).



Slika 19: Taksonomska sestava metagenoma »Echo Passage« na nivoju domen, ki smo jo opredelili z orodji NCB Classifier, IMG/M, MG-RAST in AMPHORA



Slika 20: Taksonomska sestava metagenoma »Echo Passage« na nivoju debel, ki smo jo opredelili z orodjem AMPHORA

V nadaljevanju smo že anotirana metagenomska zaporedja genov za 16S rRNA (107 bakterijskih in 28 arhejskih genov) taksonomsko uvrstili s tremi različnimi orodji: MLTreeMap, RDP Classifier in RAxML EPA.

Z algoritmom **RAxML EPA**, ki temelji na filogeniji, smo zanesljivo uvrstili 47 bakterijskih in 15 arhejskih zaporedij (Prilogi D in E). Velik delež (46 %) zaporedij, ki jih nismo uspeli zanesljivo filogenetsko uvrstiti, kaže na nezanesljivost avtomatiziranega taksonomskega pripisa zaporedij na osnovi podobnosti ali sestave. Bakterijska zaporedja smo uvrstili v sedem debel: Proteobacteria (13 zaporedij), Actinobacteria (8 zaporedij), Planctomycetes (6 zaporedij), Chloroflexi (5 zaporedij), Acidobacteria (3 zaporedja), Firmicutes (2 zaporedji) in Nitrospirae (1 zaporedje), 2 zaporedji sta bili sorodni metanotrofni bakteriji »*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*«, ki je predstavnik kandidatnega debela »NC10«. Osmih zaporedij nismo uspeli zanesljivo uvrstiti v nobeno od znanih bakterijskih debel in bi lahko predstavljala doslej neznane filotipe. Arhejska zaporedja smo uvrstili v debela Thaumarchaeota (7 zaporedij), Euryarchaeota (6 zaporedij) in Crenarchaeota (2 zaporedji). Rezultati kažejo na ogromno vrstno pestrost prokariotske mikrobne združbe na kapniku jamskega sistema »Kartchner caverns«. Izpostaviti velja, da je bilo število identificiranih genov za 16S rRNA ($N = 135$) v metagenomu premajhno, da bi iz taksonomskega pripisa omenjenih genov sklepali na taksonomsko (vrstno) sestavo celotnega metagenoma. Nadalje je klasifikacija metagenomskih zaporedij do nivoja vrste po navadi zelo nezanesljiva, zato se je v tem delu nismo posluževali. Poleg tega je pomembna pristranskost genov za 16S rRNA kot taksonomskih označevalcev njihova neenaka zastopanost v različnih vrstah.

Metagenomska zaporedja genov za 16S rRNA smo taksonomsko uvrstili do nivoja debela tudi z orodjema RDP Classifier in MLTreeMap. Rezultati vseh treh metod so predstavljeni v Prilogi F). Taksonomske uvrstitve z različnimi metodami se medsebojno zelo razlikujejo celo na nivoju debel, poleg tega številnih zaporedij nismo mogli uvrstiti niti do debela natančno. Rezultati kažejo na nezanesljivost pripisa tako kratkim nukleotidnim zaporedjem. Do takšnih razlik je lahko prišlo zaradi pomanjkanja filogenetskega signala, razlik v algoritmih za taksonomsko uvrstitev in/ali pristranskosti podatkovnih zbirk.

4.8.2 Filogenomska analiza metagenomskih funkcijskih označevalcev, udeleženih v primarni produkciji

Da bi potrdili izsledke Ortiz in sod. (2014), da energija jamskega sistema »Kartchner caverns« vsaj delno temelji na mikrobni primarni produkciji, smo v metagenomu »Echo Passage« s predizdelanimi profili HMM identificirali in z orodjem RAxML EPA filogenetsko umestili nekatere funkcijske označevalce, predstavljene v Preglednica . Analizirani geni so udeleženi v vseh poznanih poteh fiksacije CO₂, nitrifikaciji ali oksidaciji reduciranih žveplovih spojin. Glavni izsledki bioinformacijske analize so opisani v nadaljevanju, medtem ko so filogenetska drevesa dostopna v Prilogah H–R.

Preglednica 9: Funkcijski označevalci za primarno produkcijo, katerih metagenomska zaporedja smo filogenetsko umestili na referenčna filogenetska drevesa z algoritmom RAXML EPA

Gen	Produkt	Proces	
<i>4hbd</i>	dehidrataza 4-hidroksibutiril-CoA	3-hidroksipropionat/4-hidroksibutiratni cikel fiksacije CO ₂ ; dikarboksilat/4-hidroksibutiratni fiksacije CO ₂	KROŽENJE OGLJIKA
<i>aclB</i>	ATP citrat-liaza	reverzni cikel citronske kisline (Arnon–Buchananov cikel) fiksacije CO ₂	
<i>cbbM</i>	RuBisCO tipa II	Calvin-Bensonov cikel fiksacije CO ₂	
<i>cbbS</i>	majhna podenota encima RuBisCO tipa I	Calvin-Bensonov cikel fiksacije CO ₂	
<i>cdhD</i>	podenota delta CO-dehidrogenaze/sintaze acetil-CoA	Wood-Ljungdahlova pot fiksacije CO ₂ (reduktivna pot acetil-CoA)	
<i>cdhE</i>	podenota gama CO-dehidrogenaze/sintaze acetil-CoA	Wood-Ljungdahlova pot fiksacije CO ₂ (reduktivna pot acetil-CoA)	
<i>frdA</i>	flavoproteinska podenota fumarat-reduktaze	reverzni cikel citronske kisline (Arnon–Buchananov cikel) fiksacije CO ₂	
<i>mcr</i>	reduktaza malonil-CoA	3-hidroksipropionatni bicikel	
<i>oorA</i>	podenota alfa 2-oksoglutarat:feredoksin-oksido-reduktaze	reverzni cikel citronske kisline (Arnon–Buchananov cikel) fiksacije CO ₂	
<i>prk</i>	fosforibulokinaza	Calvin-Bensonov cikel fiksacije CO ₂	
<i>amoA</i>	podenota A amonij-monooksigenaze	aerobna oksidacija amonijaka (nitrifikacija)	KROŽENJE DUŠIKA
<i>hao/hzo</i>	oksido-reduktaza hidroksilamina/oksido-reduktaza hidrazina	anaerobna oksidacija amonijaka preko redukcije nitrita (anammox) ali sulfata (SRAO)	
<i>nxB (norB)</i>	oksido-reduktaza nitrita	aerobna oksidacija nitrita (nitrifikacija)	
<i>aprA*</i>	reduktaza adenzin-5'-fosfosulfata	oksidacija sulfita po APS-poti	KROŽENJE ŽVEPLA
<i>dsrA*</i>	disimilatorna reduktaza sulfita	oksidacija sulfida	
<i>soxB</i>	komponenta SoxB encimskega kompleksa Sox za oksidacijo reduciranih žveplavih spojin	oksidacija tiosulfata po Sox-poti	
<i>sqr</i>	sulfid:kinon-reduktaza	oksidacija sulfida	

*Reduktazi Apr in Dsr sta lahko udeleženi tako pri oksidaciji (litotrofija) ali redukciji (sulfatna respiracija) žveplavih spojin.

APS, adenzin-5'-fosfosulfat; RuBisCO, karboksilaza/oksigenaza ribuloza-1,5-bisfosfata.

Fiksacija CO₂. V metagenomu »Echo Passage« smo identificirali zaporedja indikatorskih encimov, ki sodelujejo v vseh šestih poznanih avtotrofnih poteh fiksacije CO₂:

- (1) Calvin-Bensonov cikel (analizirana indikatorska encima sta RuBisCO in fosforibulokinaza),
- (2) reduktivni cikel citronske kisline ali Arnon-Buchananov cikel (analiziran indikatorski encim je ATP-citrat-liaza),
- (3) reduktivna pot acetil-CoA ali Wood–Ljungdahlova pot (analiziran indikatorski encim je CO-dehidrogenaza/sintaza acetil-CoA),
- (4) 3-hidroksipropionatni (bi)cikel (analiziran indikatorski encim je reduktaza malonil-CoA),
- (5) 3-hidroksipropionat/4-hidroksibutiratni cikel (analiziran indikatorski encim je dehidrataza 4-hidroksibutiril-CoA),
- (6) dikarboksilat/4-hidroksibutiratni cikel (analiziran indikatorski encim je dehidrataza 4-hidroksibutiril-CoA).

Identificirali smo 13 zaporedij velike podenote RuBisCO-a, ki sodeluje v Calvin-Bensonovem ciklu fiksacije CO₂. Od teh se je 11 zaporedij uvrščalo med RuBisCO tipa I, eno zaporedje med RuBisCO tipa III in eno med encimu RuBisCO podobne beljakovine (RLP). RLP ne sodelujejo v fiksaciji CO₂, temveč v presnovi žvepla (Tabita in sod., 2007). Identificirali smo 2 mali podenoti encima RuBisCO, ki sta se uvrščali med proteobakterijske. RuBisCO-a tipa II nismo uspeli identificirati. Poleg tega smo identificirali tudi 11 fosforibulokinaznih metagenomskih zaporedij, ki pa jih nismo uspeli zanesljivo filogenetsko uvrstiti, vendar so se vsi uvrščali v domeno Bacteria.

Identificirali smo 50 zaporedij dehidrataze 4-hidroksibutiril-CoA, ki sodeluje v 3-hidroksipropionat/4-hidroksibutiratnem in dikarboksilat/4-hidroksibutiril-CoA ciklu fiksacije CO₂, ki ju najdemo pri arhejah. Od teh se je 36 (72 %) zaporedij filogenetsko grupiralo s predstavniki Thaumarchaeota, ki najverjetneje fiksirajo CO₂ po energetsko učinkoviti 3-hidroksipropionat/4-hidroksibutiratni poti (Könneke in sod., 2014). Ostalih 14 zaporedij se je grupiralo z bakterijskimi in verjetno ne sodelujejo v fiksaciji CO₂, saj je omenjen encim pri bakterijah udeležen v fermentaciji (Gerhardt in sod., 2000).

Identificirali smo 9 zaporedij ATP-citrat-liaze, ki sodeluje v reverznem ciklu citronske kisline – še enim od alternativnih poti fiksacije CO₂. Vsa zaporedja so se grupirala s predstavniki Nitrospirae. Izbranih encimov, ki sodelujejo v Wood-Ljungdahlovi poti fiksacije CO₂ ali 3-hidroksipropionatnem biciklu, nismo uspeli detektirati.

Nitrifikacija. Identificirali smo 12 bakterijskih metagenomskih zaporedij amonij-monooksigenaze (AmoA) in metan-monooksigenaze (PmoA), udeleženih pri nitrifikaciji (AmoA) in metanotrofiji (PmoA). Naši rezultati potrjujejo hipotezo, da sta AmoA in PmoA homologna encima (Holmes in sod., 2005). Iz tega razloga je na podlagi filogenije težko razlikovati med AmoA in PmoA. Velja, da lahko AmoA poleg amonijaka oksidirajo tudi metan, medtem ko PmoA navadno oksidirajo le metan (Akiyama in sod., 2014). Vendarle glede na najsorodnejše encime sklepamo, da 5 zaporedij predstavlja PmoA in 7 zaporedij predstavlja AmoA.

Identificirali smo 13 arhejskih zaporedij AmoA, od katerih so se vsa uvrščala v deblo Thaumarchaeota. Število identificiranih arhejskih zaporedij AmoA je tako skoraj dvakrat presegalo število bakterijskih zaporedij AmoA. Zaporedij oksidoreduktaze nitrita, ki sodeluje pri oksidaciji nitrita, nismo uspeli identificirati.

Anaerobna oksidacija amonijaka. Identificirali smo 2 metagenomski zaporedji hidroksilamin-oksidoreduktaz (Hao)/hidrazin-oksidoreduktaz (Hzo), udeleženih v bakterijski aerobni oksidaciji hidroksilamina (Hao) in anaerobni oksidaciji amonijaka (Hzo). Hao in Hzo sta homologna encima (Klotz in sod., 2008), zato je ločevanje med Hao in Hzo težavno. Poleg tega lahko Hao in Hzo oksidirata oba substrata – hidroksilamin in hidrazin (Klotz in sod., 2008). Vendarle glede na najsorodnejše encime sklepamo, da sta identificirani zaporedji Hao in tako zaporedij, ki bi bila udeležena v anaerobni oksidaciji amonijaka, nismo zasledili.

Oksidacija reduciranih žveplovih spojin. Identificirali smo 7 zaporedij reduktaze adenozin-5'-fosfosulfata (Apr). Med njimi so se le 4 grupirala z encimi oksidatorjev sulfita

po APS-poti (žveplovi litotrofi), 3 zaporedja pa so se grupirala s sulfatnimi respiratorji. Vsa 4 zaporedja so se uvrščala med proteobakterijska. Zaporedij disimilatorne reduktaze sulfita, ki oksidira sulfid, nismo identificirali. Reduktazi Apr in Dsr sta lahko udeleženi tako pri oksidaciji (litotrofija) ali redukciji (sulfatna respiracija) žveplovih spojin; njuno funkcijo smo pripisali glede na funkcijo najsorodnejšega zaporedja.

Identificirali smo 3 metagenomska zaporedja SoxB, ki je del kompleksa Sox, udeležene v oksidaciji tiosulfata. Vsa zaporedja so se uvrščala med proteobakterijska. Zaporedij sulfid:kinon-reduktaze, udeležene v oksidaciji sulfida, nismo identificirali.

4.8.3 Analiza genov za encime in naravne produkte biotehnološkega pomena

Vzporedno s pregledovanjem metagenomskih knjižnic smo v okviru projekta »Po kreativni poti do praktičnega znanja: Bioinformatika za obdelavo bioloških podatkov« opredelili zastopanost in taksonomsko uvrstili hidrolaze v metagenomu »Echo Passage« (Pangerčič in sod., 2014). Izsledki bioinformacijske analize preiskovanih hidrolaz so pokazali, da so najbolj zastopane hidrolaze v metagenomu lipaze (49 %) in beta-glukozidaze (20 %), medtem ko proteaz nismo uspeli identificirati. Kar 45 % avtomatsko anotiranih hidrolaz ni izkazovalo zanesljive podobnosti z že znanimi zaporedji ali pa jih nismo uspeli zanesljivo filogenetsko uvrstiti in smo jih zato izločili iz nadaljnje analize. Velika večina metagenomskih hidrolaz je kazala manj kot 50-odstotno enakost z že znanimi hidrolazami. Filogenetska uvrstitev zaporedij z orodjem RAXML je pokazala, da se domnevne metagenomske lipaze, beta-glukozidaze in esteraže uvrščajo predvsem v debli Actinobacteria in Proteobacteria, alfa-amilaze predvsem v deblo Planctomycetes in endoglukanaze v deblo Chloroflexi. Rezultati kažejo na smotrnost iskanja omenjenih hidrolaz v mikrorganizmih iz jamskih okolij.

Z orodjem NaPDoS smo v metagenomu »Echo Passage« identificirali 79 domnevnih KS-domen in eno domnevno C-domeno. Iz nadaljnje analize smo izločili 55 zaporedij, za katere smo z algoritmom BLAST ugotovili, da so del sintaz maščobnih kislin (FAS ali PUFA). Le-te so udeležene v primarnem metabolizmu in jih zato ne uvrščamo med naravne produkte. Preostalim 24 domnevnim KS-domenam in domnevni C-domeni smo poiskali (a) najpodobnejša zaporedja znotraj podatkovne zbirke »NaPDoS z algoritmom BlastP in (b) najpodobnejša zaporedja znotraj podatkovne zbirke »NCBI nr« z algoritmom BlastX (Preglednici 10 in 11). Vsa identificirana metagenomska zaporedja KS- in C-domen so izkazovala ≤ 85 -odstotno podobnost z zaporedji iz podatkovne zbirke NaPDoS. Prav tako večina zaporedij ni izkazovala visoke enakosti (> 80 %) z zaporedji v podatkovni zbirki »GenBank nr«, kar nakazuje, da bi lahko preiskovane domene bile udeležene v še neznanih biosinteznih poteh (Ziemert in sod., 2012). Po drugi strani je še posebej v primeru KS-domen potrebna posebna previdnost pri pripisu funkcije identificiranim kandidatnim metagenomskim KS-domenam, saj imajo geni v PKS in FAS kompleksno in prepleteno evolucijo. Pripis funkcije, kot že omenjeno, dodatno otežuje pomanjkanje filogenetskega signala v kratkih metagenomskih zaporedjih. Posledično je lahko velik delež kandidatnih KS-domen v PKS v resnici del FAS. Domnevne KS-domene in C-domeno smo funkcijsko klasificirali na osnovi filogenije, kot je razvidno v Prilogah T–Z.

Rezultati naših prejšnjih raziskav in magistrskega dela nakazujejo, da so jamski mikroorganizmi obetaven vir novih hidrolaz kot tudi poliketidov in neribosomskih peptidov.

Preglednica 5: Domnevne metagenomske ketosintazne (KS) domene, ki smo jih identificirali z orodjem NaPDoS, in njim najpodobnejša zaporedja znotraj podatkovnih zbirk NaPDoS (algoritem BlastP) in »NCBI NR proteins« (algoritem BlastX). Z odebeljenim tiskom so označeni najboljši zadetki znotraj podatkovne zbirke »NCBI NR proteins«, ki so udeleženi v sintezi sekundarnih metabolitov

Metagenomska zaporedja [dolžina nukleotidnega zaporedja]	Predviden razred KS-domene	Opis najpodobnejšega zaporedja znotraj podatkovne zbirke NaPDoS [dostopna številka] (produkt sintezne poti)	% enakosti z najpodobnejšim zaporedjem iz podatkovne zbirke NaPDos (%)	Opis najpodobnejšega zaporedja znotraj podatkovne zbirke "NCBI nr" (dostopna številka)	% enakosti z najpodobnejšim zaporedjem v podatkovni zbirki refseq_prot (%)
GG70X8M02GD GCS [462 nt]	modularna	MtaF [Q9RFK6] (miksotiazol)	74	hypothetical protein [<i>Fischerella</i> sp.] (515877828)	75
GG70X8M01CG WDR [351 nt]	modularna	EpoD [Q9L8C7] (epotilon)	62	PuwE [<i>Cylindrospermum alatosporum</i>] (719239418)	71
KCEPM_contig0 2029 [765 nt]	iterativna	Avi [AAK83194] (avilamicin)	52	beta-ketoacyl synthase [<i>Methylocella silvestris</i>] (501587425)	83
GG70X8M01AN Q8Q [282 nt]	modularna	EpoD [Q9L8C7] (epotilon)	51	amino acid adenylation domain protein [<i>Caldithrix abyssi</i>] (493986646)	56
GG70X8M02FG P9D [363 nt]	hibridna	EpoC (epotilon) [Q9L8C8]	63	thioester reductase [<i>Beijerinckia indica</i>] (501352218)	77
GG70X8M02JS DNE [462 nt]	iterativna	HSAF (HSAF) [ABL86391]	56	beta-ketoacyl synthase [<i>Tolypothrix bonteillei</i>] (692215250)	73
GG70X8M01CN 50C [303 nt]	endiin	Maduro_10 [AAQ171] (maduropeptin)	66	hypothetical protein [<i>Scytonema hofmanni</i>] (516352091)	70
GG70X8M02HM KOO [345 nt]	modularna	CurL (kuracin) [AAT70107]	60	type I PKS, partial [uncultured bacterium] (661348875)	75
GG70X8M02IIH WI [510 nt]	modularna	EpoE [Q9L8C6] (epotilon)	66	beta-ketoacyl synthase [<i>Cyanospora</i> sp. CCY0110] (495550519)	68
GG70X8M01BZ 4F8 [219 nt]	modularna	EpoD [Q9L8C7] (epotilon)	70	amino acid adenylation domain protein [<i>Caldithrix abyssi</i>] (493986646)	59
GG70X8M02JXJ FI [468 nt]	modularna	CurL [AAT70107] (kuracin)	69	JamJ [<i>Hydrogenophaga</i> sp.] (497202915)	78
GG70X8M01AY OYP [363 nt]	tipel	AknC (aklacinomicin) [AAF70107]	39	hypothetical protein [beta proteobacterium] (655417541)	60
GG70X8M01BF VMB [333 nt]	modularna	EpoD [Q9L8C7] (epotilon)	60	beta-ketoacyl synthase, C-terminal domain protein, partial [<i>Lyngbya aestuarii</i>] (553732361)	67

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 10: Domnevne metagenomske ketosintazne (KS) domene, ki smo jih identificirali z orodjem NaPDoS, in njim najpodobnejša zaporedja znotraj podatkovnih zbirk NaPDoS (algoritem BlastP) in »NCBI NR proteins« (algoritem BlastX). Z odebeljenim tiskom so označeni najboljši zadetki znotraj podatkovne zbirke »NCBI NR proteins«, ki so udeleženi v sintezi sekundarnih metabolitov.

Metagenomska zaporedja [dolžina nukleotidnega zaporedja]	Predviden razred KS-domene	Opis najpodobnejšega zaporedja znotraj podatkovne zbirke NaPDoS [dostopna številka] (produkt sintezne poti)	% enakosti z najpodobnejšim zaporedjem iz podatkovne zbirke NaPDos (%)	Opis najpodobnejšega zaporedja znotraj podatkovne zbirke "NCBI nr" (dostopna številka)	% enakosti z najpodobnejšim zaporedjem v podatkovni zbirki refseq_prot (%)
GG70X8M01B1 UO8 [444 nt]	hibridna	EpoC [Q9L8C8] (epotilon)	59	hypothetical protein, partial [<i>Fischerella thermalis</i>] (648394777)	61
GG70X8M02HQ MK7 [240 nt]	iterativna	HSAF (HSAF) [ABL86391]	60	amino acid adenylation enzyme/TR family protein [<i>Cylindrospermum stagnale</i>] (505141190)	71
GG70X8M02HN NLX [321 nt]	hibridna	EpoC (epotilon) [Q9L8C8]	56	hypothetical protein [<i>Fischerella</i> sp.] (515878151)	57
GG70X8M02HA Z8G [297 nt]	KS1	StiA (stigmatelin) [Q8RJY6]	84	polyketide synthase [<i>Saccharopolyspora erythraea</i>] (497636944)	94
GG70X8M01E0 VDY [522 nt]	hibridna	EpoC (epotilon) [Q9L8C8]	62	hypothetical protein [<i>Scytonema hofmanni</i>] (657933315)	72
GG70X8M02H2 AZH [345 nt]	tipel	AlnL [ACI88861] (alnumericin)	64	putative type II PKS KS α-subunit, partial [uncultured bacterium] (459228951)	89
GG70X8M01A5 NRX [312 nt]	modularna	EpoD [Q9L8C7] (epotilon)	57	beta-ketoacyl synthase [<i>Methylocella silvestris</i>] (501587425)	74
GG70X8M01B2 004 [399 nt]	hibridna	MtaD (mikсотiazol) [Q9RFK8]	66	modular PKS, partial [uncultured bacterium] (108794959)	69
GG70X8M02F6J IL [357 nt]	hibridna	EpoC (epotilon) [Q9L8C8]	47	NRPS [<i>Neorhizobium galegae</i>] (659656576)	67
GG70X8M02G9 DID (408 nt)	tipel		36	beta-ketoacyl synthase [<i>Hyphomicrobium denitrificans</i>] (502980820)	90
GG70X8M01C5 P7Q [309 nt]	hibridna	JamP (jamajkamid) [AAS98787]	65	thioester reductase [<i>Nitratireductor pacificus</i>] (495872699)	71

FAS, sintaza maščobnih kislin (ang. *fatty-acid synthase*); HSAF, temperaturno stabilen protiglivni dejavnik (ang. *heat-stable antifungal factor*); NRPS, neribosomska sintaza poliketidov; PKS, poliketid-sintaza.

Preglednica 11: Domnevna metagenomska kondenzacijska (C) domena, ki smo jo identificirali z orodjem NaPDoS, in njej najpodobnejšega zaporedja znotraj podatkovnih zbirk »NCBI nr« (algoritem BlastX) in NaPDoS (algoritem BlastP)

Metagenomska zaporedja [dolžina nukleotidnega zaporedja]	Domnevni razred C- domene	Oznaka najpodobnejšega zaporedja znotraj podatkovne zbirke NaPDoS [dostopna številka] (sekundarni metabolit)	% enakosti z najpodobn- ejšim zaporedjem iz podatkovne zbirke NaPDos (%)	Opis najpodobnejšega zaporedja znotraj podatkovne zbirke "NCBI nr" (dostopna številka)	% enakosti z najpodobne- jšim zaporedjem v podatkovni zbirki refseq_prot (%)
KCEPM_contig 01689 [795 nt]	LCL	liche1_C2_LCL (lichenicin)	37	condensation domain- containing protein [<i>Beijerinckia indica</i>] (501352219)	59

5 RAZPRAVA

5.1 VZORČENJE

Pravilno vzorčenje je ključnega pomena pri izdelavi nepristranske metagenomske knjižnice ali neposrednem sekvenciranju celokupne okoljske DNA. Ob tem je priporočljivo izbrati ekosistem večkrat preliminarno vzorčiti in tako opredeliti (a) minimalni potreben napor pregledovanja (količino vzorca), (b) tehnično variacijo in (c) biološko variacijo (Thomas in sod., 2012). Opredelitev biološke variacije je potrebna, ker so mikrobne združbe časovno in prostorsko dinamične entitete, saj njihova sestava v času in v različnih delih ekosistema ni stalna. Šele ko poznamo časovno in prostorsko variacijo v sestavi mikrobnih združb znotraj določenega ekosistema, lahko ekosisteme medsebojno primerjamo (Zhou in sod., 2015).

Z naraščajočim številom metagenomskih študij narašča potreba po njihovi primerjavi, kar zahteva standardizacijo opisa in anotacije metagenomskih podatkov. V ta namen je konzorcij »Genomic Standards Consortium« izdal standarde za minimalno informacijo o metagenomskih podatkih/vzorcih (ang. *minimum information about a metagenome sequence*, MIMS), ki med drugim vključujejo natančen opis časa in kraja odvzema vzorca (Field in sod., 2008). Poleg tega je za opredelitev vpliva okoljskih dejavnikov na sestavo mikrobne združbe pomemben čim bolj vseobsegajoč opis fizikalnih in geokemičnih parametrov v okolju, saj le-ti vplivajo na njeno raznolikost in evolucijo (Alsop in sod., 2014).

Pri vzorčenju jamskih mikrobnih prevlek, iz katerih smo pripravili metagenomski knjižnici, je pomembno, da se izogibamo zajetju spodaj ležečih kamnin in tal. Tla so znana po visoki vsebnosti nečistoč, kot so huminske kisline, ki otežujejo nadaljnjo molekularno-biološko manipulacijo DNA. Hkrati se moramo izogibati kontaminaciji vzorca, npr. s strani vzorčevalca ali iz zraka. Smiselna je tudi opredelitev obsega kontaminacije. Ortiz in sod. (2013) so obseg kontaminacije opredelili tako, da so v jami tekom vzorčenja sterilni bris izpostavili zraku za eno minuto. V našem primeru smo odsotnost kontaminacij zagotavljali s sterilnim materialom za odvzem vzorcev in sterilnimi vsebniki za hranjenje vzorcev. Poleg standardiziranega vzorčenja je pomembna tudi standardizacija rokovanja z vzorcem, obdelave vzorca ter shranitve vzorca do uporabe.

5.2 IZOLACIJA METAGENOMSKE DNA

Ob izolaciji okoljske DNA prihaja do pristranskosti pri lizi celic, saj različne celice zaradi različne sestave celičnega ovoja različno uspešno lizirajo. Primer so grampozitivne bakterije iz debel Actinobacteria in Firmicutes, ki zaradi debelega peptidoglikanskega sloja težje lizirajo. Za popolno lizo celic iz omenjenih bakterijskih debel je poleg encimske lize običajno potrebna še mehanska liza, npr. s kroglicami (ang. *bead-beating*; Biesbroek in sod., 2012). V primeru vzorcev jamskih mikrobnih prevlek pa tovrstni način lize vodi v fragmentacijo DNA, saj dobimo fragmente velikosti 20 kb (komercialni komplet »PowerSoil DNA Isolation Kit«; MoBio, ZDA). Iz navedenega razloga smo pri izolaciji mehansko poskušali doseči le razbitje celičnih agregatov na posamezne celice, medtem ko smo lizo celic povzročili kemično.

Fozmidna knjižnica iz sivih mikrobnih prevlek je vsebovala le 500 klonov, medtem ko je knjižnica iz rožnatih mikrobnih prevlek vsebovala 70.000 klonov. Predvidevamo, da je vzrok manjša uspešnost izolacije DNA iz sivih mikrobnih prevlek. Tudi v prejšnjih študijah so ne glede na metodo izolacije iz sivih mikrobnih prevlek DNA izolirali v manjši koncentraciji kot iz prevlek drugih barv (L. Pašić, neobjavljeni podatki). Že priprava klonske knjižnice genov za 16S rRNA iz sivih mikrobnih prevlek je bila težavna in je imela manjše število klonov z vključkom kot knjižnice iz preostalih jamskih mikrobnih prevlek (Cuezva in sod., 2012). Ena od možnih razlag je, da sive mikrobne prevleke vsebujejo visok delež bakterijskih vrst z debelim peptidoglikanskim slojem in med izolacijo DNA ne lizirajo popolnoma. Poleg tega bi bili lahko številni fragmenti DNA iz sivih mikrobnih prevlek težavni za kloniranje (npr. višji delež fragmentov z visoko vsebnostjo baznih parov AT, toksičnost za celico). Drugi možni vzroki so manjša celična gostota in večja vsebnost nečistoč. Cuezva in sod. (2012) poročajo, da so v sivih mikrobnih prevlekeh pogosto prisotne zunajcelične polimerne substance in precipitati. Ti bi lahko oteževali nadaljnjo molekularno-biološko manipulacijo DNA. Rezultati kažejo na potrebo po dodatni optimizaciji metode izolacije DNA iz sivih mikrobnih prevlek. Okoljski DNA, ki bi jo izolirali z različnimi metodami, bi lahko določili (a) »prstni odtis« združbe (ang. *community fingerprinting*), (b) jo naključno sekvencirali ali (c) ji določili število kopij tarčnih genov (npr. genov za 16S rRNA) s kvantitativno PCR. Vse te pristope bi lahko uporabili za opredelitev pristranskosti izolacije okoljske DNA iz sivih mikrobnih prevlek z različnimi metodami.

5.3 TEHNIČNE POSEBNOSTI PRI PRIPRAVI IN ANALIZI KLONSKIH KNJIŽNIC

Za uspešno pripravo fozmidne knjižnice je predpogoj izolacija okoljske DNA zadostne koncentracije ($\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$) in čistosti, saj med postopkom priprave knjižnice prihaja do izgub DNA. Ob tem je kritičen postopek ekstrakcije DNA želene velikosti iz nizkotališčne agaroze z agarazo. Omenimo naj, da postopek priprave zahteva visoke začetne koncentracije DNA, saj je količina agaraze omejena, kar vpliva na izkoristek reakcij v komercialnem kompletu. V tem koraku prihaja tudi do izgub DNA pri njenem obarjanju, saj je čista DNA prozorna in jo lahko po obarjanju nevede odstranimo skupaj z etanolom.

Posebna previdnost je potrebna tudi pri shranjevanju fagnih delcev. Ti so izredno občutljivi za zamrzovanje in odtajanje, zato jih lahko odtalimo le enkrat. Nadalje uspešnost sestavljanja in okužbe pada s starostjo delcev kljub shranjevanju pri -80°C . Poleg tega so fagni delci občutljivi za strižne sile in mehurčke, ki nastanejo pri pipetiranju in ki se jim vedno ni mogoče izogniti.

Shranjevanje fozmidne knjižnice kot pomnožene knjižnice je sicer ugodno iz stališča prostora, saj marsikateri laboratorij ne premore kapacitet za shranjevanje 70.000 klonov (npr. 730 mikrotitrskih plošč s 96 jamicami) v obliki trajnih kultur. Opozoriti je treba, da je ob tovrstnem shranjevanju smiselno povečati napor pri pregledovanju knjižnice, saj ob vnovični nacepitvi na trdno gojišče številne kolonije vsebujejo enake vključke. Po drugi strani lahko tovrstne knjižnice preiskujemo s pristopi, ki temeljijo na zaporedjih (npr. *pooled PCR*).

Kljub priporočilom proizvajalca kompleta »pCC1FOS CopyControl« smo z rezultati tega magistrskega dela pokazali, da fozmide lahko uspešno izoliramo z običajno alkalno lizo. Pri izolaciji fozmidne DNA je pomembno, da se izogibamo močnim mehanskim silam, ki lahko poškodujejo (nalomijo) fozmidno DNA. Zato je pomembno, da tekom izolacije vzorca nikoli ne mešamo naglo, temveč le z nežnim obračanjem, in da se izogibamo naglemu in prekomernemu pipetiranju. Zaželeno je tudi uporaba pipetnih nastavkov s širokimi luknjami. Prav tako fozmidno DNA shranjujemo pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v manjših alikvotih, saj lahko tudi večkratno zaporedno zamrzovanje in odtajanje DNA poškoduje fozmidno DNA. Izolacijo fozmidne DNA smo poskusili tudi z 1-butanolom. Le-tega uporabljamo za koncentriranje DNA (tudi soli), ki preidejo v spodnjo vodno raztopino. Zgornjo organsko plast zavržemo in DNA oborimo z izopropanolom. Izolacija ni bila uspešna, kar bi lahko bilo posledica velikosti fozmidnega vektorja z vključkom, ki težje zapusti celico kot običajni plazmidni vektorji.

S simulacijskimi izračuni smo pokazali, da lahko velikost genoma in dolžina preiskovanega zaporedja pomembno vplivata na predvideno izračunano število klonov, ki ga je potrebno pregledati. Preden se lotimo iskanja novih bioaktivnih snovi s pristopom funkcijske metagenomike, je smiselno vsaj v grobem poznati vrstno sestavo okolja oz. potencialni vir iskane bioaktivne snovi. Aktinobakterije, ki so glavni vir naravnih produktov, kot so poliketidi in neribosomski peptidi, imajo v povprečju 2,6-krat dvakrat večji genom (9,0 Mbp) od bakterijskega povprečja (3,4 Mbp), kar pomeni približno 2,6-krat večje število klonov, ki jih moramo pregledati. Ker v jamskem srebru aktinobakterije predstavljajo eno od prevladujočih bakterijskih debel in so eden od najobetavnejših virov preiskovanih bioaktivnih snovi, to povečuje napor pri pregledovanju metagenomske fozmidne knjižnice ne glede na izvor iskane bioaktivne snovi.

Nadalje smo pokazali, da na število klonov, ki jih moramo pregledati, pomembno vpliva velikost preiskovanega zaporedja. Medtem ko bil vpliv dolžine genov za preiskovane hidrolaze na napor pregledovanja klonov zanemarljiv, so po drugi strani gruče genov NRPS/PKS pogosto prevelike za iskanje s pristopom funkcijske metagenomike. Fozmidi se tako zdijo manj primerni vektorji za iskanje intaktnih novih poliketidov in neribosomskih peptidov, medtem ko so primerni vektorji za iskanje novih hidrolaz. Za iskanje novih poliketidov in naravnih produktov bi bila (kot že omenjeno) smiselna uporaba vektorjev, ki lahko sprejmejo večje vključke, kot so umetni kromosomi bakterij, in/ali uporaba alternativnih gostiteljev. Craig in sod. (2009) so npr. kot gostitelja pri izdelavi kozmidne knjižnice uporabili betaproteobakterijo *Ralstonia metallidurans* in identificirali klon s protimikrobno aktivnostjo, za katero naj bi bila odgovorna domnevna PKS tipa III. Protimikrobna aktivnost se v *E. coli* ni izražala.

Večje število pozitivnih klonov bi verjetno detektirali s povečanim številom pregledanih klonov (večjim naporom pregledovanja). Presejalni testi velikega števila klonov brez avtomatizacije in miniaturizacije presejalnih testov terjajo veliko časa in sredstev, zato se je morda smiselno omejiti na manjše število preiskovanih aktivnosti in v primeru pregledovanja pomnožene knjižnice doseči vsaj dva- do trikratno pokritost izhodnega števila klonov. V primeru preiskovanja ene aktivnosti je vredno razmisliti o neposredni nacepitvi izdelane metagenomske knjižnice na diferencialno-selektivna gojišča, kar bi omogočilo takojšen presejalni test vseh klonov v knjižnici. V našem primeru smo se pri

pregledovanju fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih glede na zastopanost hidrolaznih zaporedij v metagenomu »Echo Passage« odločili za povečanje napora pregledovanja klonov za lipolitično aktivnost (hidroliza tributirina) in β -glukozidazno aktivnost, saj sta omenjena encimska zaporedja v metagenomu tudi najbolj zastopana. Pri obeh aktivnostih smo dosegli približno enkratno pokritost izhodnega števila klonov (70.000 klonov).

Naši rezultati kažejo, da je odkrivanje novih bioaktivnih snovi s pristopom funkcijske metagenomike le malo uspešno in zahteva optimizacijo ter avtomatizacijo presejalnih testov. Že tako majhno uspešnost odkrivanja novih bioaktivnih spojin dodatno omejuje tudi ponovno odkrivanje že znanih spojin.

V zadnjem času se razvija vse več visoko zmogljivostnih metod za pregledovanje metagenomskih knjižnic, ki temeljijo na avtomatizaciji in miniaturizaciji. Ti skušajo povečati delež detektiranih pozitivnih klonov z velikim številom pregledanih klonov in zanesljivejšimi presejalnimi testi. Nyssönen in sod. (2013) so fozmidne knjižnice iz listnega odpada pregledovali za različne hidrolaze z visoko zmogljivostnimi presejalnimi testi v tekočih gojiščih s kromogenim oz. fluorogenim substratom in avtomatiziranim odčitavanjem rezultatov. Pregledali so 12.160 klonov za 14 različnih encimatskih aktivnosti in identificirali 374 pozitivnih klonov (povprečna uspešnost identifikacije pozitivnega klona je bila 0,22-odstotna).

5.4 NAVIDEZNO POZITIVNI IN NAVIDEZNO NEGATIVNI KLONI FOZMIDNE KNJIŽNICE PRI PREGLEDOVANJU KLONOV Z α -KOMPLEMENTACIJO

Navidezno pozitivni kloni, ki ne izkazujejo beta-glukozidazne aktivnosti, vendar vsebujejo vključek, so lahko posledica (a) eksonukleazne aktivnosti gostiteljske celice med kloniranjem, (b) spontane mutacije v genu *lacZ α* v vektorju, (c) spontane mutacije v genu *lacZ Ω* v kromosomu ali (d) kemične nestabilnosti spojin (X-Gal) v kromogenem gojišču (Banerjee in sod., 2010; Godiska in sod., 2005). Ker smo pri pregledovanju klonov z α -komplementacijo zaznali modre kolonije, smo izvzeli možnost kemične nestabilnosti spojin v gojišču kot vzroka za pojav navidezno pozitivnih kolonij. Predpostavljamo, da je najverjetnejši vzrok za pojav navidezno negativnih klonov eksonukleazna aktivnost znotraj gostiteljske celice, saj smo v gostiteljski sev *E. coli* EPI300-T1^R vnesli lineariziran fozmidni vektor pCC1FOS. Vektor se je sicer po vnosu cirkulariziral (po elektroforezni ločitvi fozmidne DNA so bile razvidne tri konformacijske oblike) in restriksijski profil (*EcoRI* + *HindIII*) je kazal fozmidni vektor pričakovane velikosti, vendar bi lahko prišlo do odcepitve le nekaj končnih baznih parov, ki vodijo v spremembo bralnega okvirja znotraj gena *lacZ α* in posledično nastanek nefunkcionalne beta-galaktozidaze, česar z navadno gelsko elektroforezo ni mogoče zaznati. Primer eksonukleaze iz bakterije *E. coli*, ki ima za substrat dvoverižno linearno DNA, je eksonukleaza III. Pojav navidezno pozitivnih klonov bi tako verjetno zmanjšali s predhodno ligacijo (cirkularizacijo) fozmidnega vektorja pred vnosom v gostiteljski sev.

Navidezno negativni kloni, ki izkazujejo beta-glukozidazno aktivnost, vendar imajo vključek, so lahko posledica (a) ligacije krajšega vključka v vektor, katerega velikost je večkratnik števila 3 in tako ne spremeni bralnega okvirja, ter ne vključuje terminatorja transkripcije, ali (b) izražanja gena *lacZ α* s promotorjem v vključku (Godiska in sod.,

2005). V obeh primerih pride do nastanka fuzijske beta-galaktozidaze, ki (vsaj delno) ohrani svojo funkcionalnost. Zaradi velike dolžine vključkov v navidezno negativnih klonih iz fozmidne knjižnice smo izvzeli možnost nastanka funkcionalne fuzijske beta-galaktozidaze zaradi ligacije krajšega vključka v vektor, pri kateri ne pride do spremembe bralnega okvirja. Predvidevamo, da je vseh pet analiziranih klonov z različnim restrikcijskim profilom posledica izražanja fuzijske beta-galaktozidaze s strani promotorja v vključku.

5.5 KLON K10 lip+ Z DOMNEVNO LIPOLITIČNO AKTIVNOSTJO

Na diferencialnem gojišču s tributirinom smo ob pregledovanju klonov izdelanih fozmidnih knjižnic identificirali in potrdili en klon s potencialno lipolitično aktivnostjo (klon K10 lip+), ki je izhajal iz fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobnih prevlek. Klon ni izkazoval aktivnosti na nobenem od drugih diferencialnih gojišč za zaznavo lipolitične aktivnosti. Možno je, da ima klon K10 lip+ encim esterazo s substratno specifičnostjo le za preproste lipide, kot je tributirin (C4), ne pa tudi za kompleksnejše lipide, kot so olein in detergenti Tween (lipaze). Po drugi strani Litthauer in sod. (2010) poročajo o velikem deležu nestabilno in navidezno pozitivnih klonov, ki so jih identificirali na diferencialnem gojišču s tributirinom. Zaporedja vključkov fozmidnih klonov iz domnevno pozitivnih klonov v velikem deležu niso kazala podobnosti z že znanimi lipolitičnimi encimi, zato so avtorji zaključili, da je tributirin najverjetneje nespecifičen substrat, ki ne detektira zgolj lipolitične aktivnosti. Za biokemijsko karakterizacijo domnevne esteraze/lipaze iz klona K10 lip+ bi bilo potrebno najprej lipazo izolirati, kar bi lahko dosegli s subkloniranjem. Gen, odgovoren za lipolitično aktivnost, bi lahko identificirali z mutagenozo s transpozonom in nadaljnjim sekvenciranjem. Primer komercialnega kompleta za naključno insercijsko mutagenozo s transpozonom Tn5 je komplet »EZ-Tn5 <KAN-2> Insertion Kit« proizvajalca Epicentre (Epicentre, 2012b). Komplet temelji na *in vitro* naključni mutagenezi fozmidne DNA s transpozonom Tn5. Tako pridobljene mutirane fozmide nato z elektroporacijo vnesemo v gostiteljski sev *E. coli*. Tako pridobljene klone z naključno mutirano fozmidno DNA cepimo na diferencialno-selektivno gojišče, na katerem iščemo klon (klone), ki je izgubil preiskovano aktivnost zaradi prekinitve gena za preiskovano aktivnost s transpozonom Tn5. Nadalje lahko detektirani klon, ki je izgubil preiskovano aktivnost, sekvenciramo iz obeh strani navzven od mesta vstavitve transpozona Tn5 in tako določimo zaporedje preiskovanemu zaporedju, odgovornemu za preiskovano aktivnost. Gen za domnevni lipolitični encim bi najverjetneje lahko identificirali tudi z bioinformacijskimi orodji, če bi sekvencirali celoten vključek klona K10 lip+. Biokemijska potrditev in opis domnevne esteraze/lipaze sta predmet prihodnjih raziskav.

5.6 BIOINFORMACIJSKA ANALIZA METAGENOMSKIH KETOSINTAZNIH IN KONDENZACIJSKIH DOMEN

Bioinformacijska analiza KS- in C-domen v metagenomu »Echo Passage« z orodjem NaPDoS je pokazala, da so le-te v okolju redke; identificirali smo 24 domnevnih KS-domen in eno domnevno C-domeno. To potrjuje rezultate drugih raziskovalcev, ki so v metagenomskih knjižnicah, izdelanih iz DNA iz talnih in morskih mikroorganizmov, le redko zaznali gruče genov PKS (0,2–0,7 % pozitivnih klonov) (Ginolhac in sod., 2004; Pasley in sod., 2011; Schirmer in sod., 2005). Zanimivo je, da vse identificirane

metagenomske KS- in C-domene z izjemo ene kažejo manj kot 80-odstotno enakost na aminokislinskem nivoju z že znanimi KS- in C-domenami (Preglednici 8 in 9), kar kaže na potencialne nove biosintezne poti naravnih produktov. Identificirana zaporedja bi lahko uporabili za izdelavo začetnih oligonukleotidov, s katerimi bi lahko opredelili njihovo morebitno prisotnost v izdelanih metagenomskih knjižnicah.

5.7 *In silico* ANALIZA FUNKCIJSKIH OZNAČEVALCEV, KI SO UDELEŽENI V PRIMARNI PRODUKCIJI

Bioinformacijska analiza metagenoma »Echo Passage Metagenome« je pokazala, da v mikrobnih združbi na stenah kapnikov med arhejami prevladujejo arheje iz debla *Thaumarchaeota* (v nadaljevanju: taumarheje). Nadalje je analiza funkcijskih označevalcev pokazala, da imajo taumarheje pomembno vlogo primarnih producentov v jami »Kartchner caverns«. Večina (65 %) metagenomskih zaporedij AmoA (oksidacija amonijaka) se je uvrščala med taumarheje, kar kaže na velik pomen taumarhej pri kroženju dušika. V deblo *Thaumarchaeota* so se uvrščala tudi vsa arhejska zaporedja dehidrataze 4-hidroksibutiril-CoA (4HBD), ki pri taumarhejah sodelujejo v 3-hidroksibutirat/4-hidroksipropionatni (HB/HP) poti fiksacije CO₂. Encim 4HBD je bil med indikatorskimi encimi, ki so udeleženi v fiksaciji CO₂, tudi najbolj zastopan encim (36 zaporedij).

Deblo *Thaumarchaeota* je novo arhejsko deblo (Brochier-Armanet in sod., 2008), katerega predstavnike najdemo v tleh, oceanih, geotermalnih okoljih, pa tudi v jamah (Barton in sod., 2014, Reitschuler in sod., 2014, Stahl in de la Torre, 2012). Vse karakterizirane taumarheje so kemolitotrofi, ki fiksirajo CO₂ po 3-hidroksibutirat/4-hidroksipropionatni (HB/HP) poti. Taumarhejska HP/HB pot naj bi zahtevala za tretjino manjši vnos energije kot Calvin-Bensonova pot fiksacije CO₂, ki je prisotna pri bakterijah, ki oksidirajo amonijak. Poleg tega se zdi taumarhejska HP/HB pot fiksacije CO₂ energetsko učinkovitejša tudi od krenarhejske HP/HB poti in tako predstavlja energetsko najučinkovitejšo aerobno pot fiksacije CO₂ (Könneke in sod., 2014). Energetsko učinkovitost poti pojasnjujejo s tremi bistvenimi prilagoditvami: (a) aktivacijo HP in HB z ligazama, ki tvorita ADP in ne AMP; (b) promiskuiteti encimov, ki lahko katalizirajo več kot eno reakcijo v poti in (c) stabilnosti taumarhejske dehidrataze 4-hidroksibutiril-CoA v prisotnosti kisika, kar pomeni manjši vnos energije za sintezo in vzdrževanje dotičnega encima (Könneke in sod., 2014). Taumarheje imajo visoko afiniteto do amonijaka in so verjetno prevladujoči nitrifikatorji v okoljih z majhno koncentracijo amonijaka, kot so oceani in številni talni ekosistemi, sodelujejo pa tudi pri sintezi kobalamina (Doxey in sod., 2015; Stahl in de la Torre, 2012). Omenjene prilagoditve bi lahko predstavljale biokemijsko razlago za uspešnost taumarhej v oligotrofnih okoljih.

HP/HB pot fiksacije CO₂ se zaradi svoje energetske učinkovitosti zdi še posebej privlačna osnova za izdelavo sintezne poti fiksacije CO₂. Čeprav je biotehnološka uporabnost HP/HB poti še precej neraziskana, so nekateri avtorji že poskusili izrabiti omenjeno pot fiksacije CO₂ v biotehnološke namene (Könneke in sod., 2014). Keller in sod. (2013) so v bakteriji *Pyrococcus furiosus* uspešno heterologno izrazili gene iz arheje *Metallosphaera sedula*, katerih produkti so udeleženi v prvem delu poti HP/HB (vgradnji CO₂ v HP). Rekombinantni sev je uspešno fiksiral CO₂, oksidirал vodik in ga pretvoril v HP, pri čemer

vodik deluje kot reducent. HP je eden od pomembnejših osnovnih gradnikov v industrijsko-biotehnoloških procesih.

Zaključimo lahko, da imajo taumarheje v jami »Kartchner caverns« pomembno vlogo pri kroženju ogljika in dušika. Taumarheje fiksirajo CO₂ po energetsko učinkoviti HP/HB poti in oksidirajo NH₃ v procesu nitrifikacije – v jamah imajo tako pomembno vlogo kot primarni producenti (kemolitoavtotrofi). Poleg tega bi lahko predstavljale zanemarljiv vir biotehnološko zanimivih encimov, kot so ureaze in karboksilaze.

6 SKLEPI

- Hipotezo, da so predstavniki Actinobacteria eni od prevladujočih taksonov v rožnatih prevlekeh na stenah kraških jam, smo potrdili z molekularno-taksonomskimi analizami. V izdelanih klonskih knjižnicah je bil prevladujoči filotip (22 % zaporedij) najbolj soroden aktinobakteriji *Actinomycetospora rishiriensis*. Po zastopanosti mu sledi filotip, soroden gamaproteobakteriji *Thiohalomonas denitrificans* (11 % zaporedij), in filotip, soroden gamaproteobakteriji *Porphyromonas uvarum* (8 % zaporedij).
- Iz vzorcev mikrobnih prevlek sten kraških jam smo izolirali okoljsko DNA ustrezne velikosti in koncentracije in uspešno pripravili fozmidni knjižnici iz rožnatih in sivih mikrobnih prevlek, ki sta vsebovali 70.000 in 500 klonov.
- V dveh izdelanih fozmidnih knjižnicah smo pregledali skupno 374.500 klonov za 15 različnih aktivnosti. Identificirali in potrdili smo en klon s potencialno lipolitično aktivnostjo. Prisotnosti protimikrobne aktivnosti pri 121.500 pregledanih klonih nismo opazili. Po drugi strani smo z bioinformacijsko analizo metagenomskih ketosintaznih in kondenzacijske domene pokazali, da so jamski mikroorganizmi potencialni vir novih poliketidov in neribosomskih peptidov. Pokazali smo tudi, da je iskanje gruč genov NRPS/PKS s funkcijsko-metagenomskim pristopom težavno, saj so le-te pogosto prevelike, da bi jih v celoti uspeli zajeti v fozmidnih metagenomskih knjižnicah.
- V jamskem metagenomu »Echo Passage« prevladujejo bakterije iz debel Proteobacteria, Actinobacteria in Firmicutes ter arheje iz debla Thaumarchaeota (taumarheje). Bakterijski debli Proteobacteria in Actinobacteria prevladujeta tudi v jamskem srebru na stenah kraških jam, medtem ko arhejskih zaporedij v klonskih knjižnicah iz jamskega srebra nismo zaznali. Prav tako v jamskem srebru navadno nismo zaznali pripadnikov Firmicutes.
- Bioinformacijska analiza metagenoma »Echo Passage« nakazuje, da energija jamskega ekosistema »Kartchner caverns« vsaj delno izhaja iz energije primarnih producentov. Med jamskimi kemolitotrofi zasledimo taumarheje, ki imajo verjetno v jamskem sistemu »Kartchner caverns« pomembno biogeokemično vlogo, saj oksidirajo CO₂ po energetsko učinkoviti 3-hidroksibutirat/4-hidroksipropionatni poti in oksidirajo amonijak v procesu nitrifikacije.

7 POVZETEK

Jame predstavljajo mikrobni habitat, za katerega so značilni pomanjkanje hranil in odsotnost svetlobe ter povezanost z zunanjim svetom s pronicanjem talne vode, menjavo zračnih mas (kondenzacijo vode), poplavami in živimi bitji. Na stenah kraških jam mikrobi pogosto tvorijo specifične tenke prevleke, ki na značilen način odsevajo svetlobo. V okviru tega magistrskega dela smo pripravili skupno dve metagenomski fozmidni knjižnici iz rožnatih (70.000 klonov) in sivih (500 klonov) mikrobni prevlek iz Pajsarjeve jame (Slovenija). Fozmidni knjižnici smo s funkcijsko-metagenomskim pristopom pregledovali za sedem različnih hidrolitičnih aktivnosti (amilazna, beta-glukozidazna, endoglukanazna, hitinazna, ksilanazna, lipolitična, proteazna aktivnost) in protimikrobno aktivnost proti trem različnim indikatorskim mikroorganizmom (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*). Za omenjene encimske in protimikrobne aktivnosti smo skupno pregledali celotno knjižnico iz sivih mikrobni prevlek in subpopulacijo 320.000 klonov pomnožene fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobni prevlek. Pregledovanje knjižnic je vodilo v identifikacijo enega klona fozmidne knjižnice iz rožnatih mikrobni prevlek s potencialno lipolitično aktivnostjo, ki je stabilno izražal lipolitično aktivnost (hidroliza tributirina). Pregledovanje fozmidni knjižnic s funkcijsko-metagenomskim pristopom, ki temelji na indikatorskih gojiščih, se je v odsotnosti avtomatizacije in standardizacije izkazalo za le malo uspešno. Sekvenciranje celotne okoljske DNA z novejšimi tehnologijami nam omogoča vpogled v funkcijski potencial združbe in nas lahko usmeri na najobetavnejše aktivnosti, ki bi jih v danem okolju preiskovali s funkcijsko-metagenomskim pristopom.

8 VIRI

- Adrio J.L., Demain A.L. 2014. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4: 117–139
- Akiyama H., Morimoto S., Tago K., Hoshino Y.T., Nagaok K., Yamasaki M., Karasawa T., Takenakab M., Hayatsu M. 2014. Relationships between ammonia oxidizers and N₂O and CH₄ fluxes in agricultural fields with different soil types. *Soil Science and Plant Nutrition*, 60, 4: 520–529
- Alsop E.B., Boyd E.S., Raymond J. 2014. Merging metagenomics and geochemistry reveals environmental controls on biological diversity and evolution. *BMC Ecology*, 14: 16, doi:10.1186/1472-6785-14-16: 12 str.
- Amore A., Giacobbe S., Faraco V. 2013. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, 14: 230–249
- Anand S., Mohanty D. 2013. Computational methods for identification of novel secondary metabolite biosynthetic pathways by genome analysis. V: *Bioinformatics: Concepts, methodologies, tools, and applications*. Vol. 3. Khosrow-Pour M. (ed.). Hershey, IGI Global: 1642–1666
- Baltz R.H. 2007. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the future. *Microbe*, 2, 3: 125–131
- Barone R., de Santi C., Esposito F.P., Tedesco P., Galati F., Visone M., di Scala A., de Pascale D. 2014. Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes and bioactive compounds discovery. *Frontiers in Marine Science*, 1: 38, doi: 10.3389/fmars.2014.00038: 6 str.
- Barrow G.I., Feltham R.K.A. (eds.). 2004. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge, Cambridge University Press: 352 str.
- Bazinet A.L., Cummings M.P. 2012. A comparative evaluation of sequence classification programs. *BMC Bioinformatics*, 13: 92, doi: 10.1186/1471-2105-13-92: 13 str.
- Béjà O., Spudich E.N., Spudich J.L., Leclerc M., DeLong E.F. 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature*, 411: 786–789
- Bérdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58, 1: 1–26
- Berger S.A., Krompass D., Stamatakis A. 2011. Performance, accuracy, and Web server for evolutionary placement of short sequence reads under maximum likelihood. *Systematic Biology*, 60, 3: 291–302
- Bergmann J.C., Costa O.Y.A., Gladden J.M., Singer S., Heins R., D'haeseleer P., Simmons B.A., Quirino B.F. 2014. Discovery of two novel β -glucosidases from an Amazon soil metagenomic library. *FEMS Microbiology Letters*, 351, 2: 147–155
- Bhat A., Riyaz-Ul-Hassan S., Ahmad N., Srivastava N., Johri S. 2013. Isolation of cold-active, acidic endocellulase from Ladakh soil by functional metagenomics. *Extremophiles*, 17, 2: 229–239
- Bhat M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18: 355–383
- Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R.K. 2007. Bacterial chitinases: Properties and potential. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27, 1: 21–28
- Birnboim H.C., Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 6: 1513–1523

- Brady S.F. 2007. Construction of soil environmental DNA cosmid libraries and screening for clones that produce biologically active small molecules. *Nature Protocols*, 2: 1297–1305
- Brieger J., Weidt J.W., Decker J. 2000. Fast, non-toxic, and inexpensive *n*-butanol preparation of recombinant plasmids. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 2: 299–300
- Chang Z., Sitachitta N, Rossi J.V., Roberts M.A., Flatt P.M., Jia J., Sherman D.H., Gerwick W.H. 2004. Biosynthetic pathway and gene cluster analysis of curacin A, an antitubulin natural product from the tropical marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 67, 8: 1356–1367
- Cheeptham N., Sadoway T., Rule D., Watson K., Moote P., Soliman L.C., Azad N., Donkor K.K., Horne D. 2013. Cure from the cave: volcanic cave actinomycetes and their potential in drug discovery. *International Journal of Speleology*, 42, 1: 35–47
- Chrisope G.L., Fox C.W., Marshall R.T. 1976. Lecithin agar for detection of microbial phospholipases. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 5: 784–786
- Chun J. 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 716–721
- Chung E.J., Lim H.K., Kim J., Choi G.J., Park E.J., Lee M.H., Chung Y.R., Lee S. 2008. Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 3: 723–730
- Craig J.W., Chang F., Kim J.H., Obiajulu S.C., Brady S.F. 2010. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse Proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 5: 1633–1641
- Craig J.W., Chang F.Y., Brady S.F. 2009. Natural products from environmental DNA hosted by *Ralstonia metallidurans*. *ACS Chemical Biology*, 4: 23–28
- Cruz J.M., Ortega M.A., Cruz J.C., Ondina P., Santiago R., Ríos-Velázquez C. 2010. Unraveling activities by functional-based approaches using metagenomic libraries from dry and rain forest soils in Puerto Rico. V: Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Vol. 2. Mendez-Vilas A. (ed.). Barcelona, Formatex Research Center: 1471–1478
- Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Porca E., Pašić L., Jurado V., Hernandez-Marine M., Serrano-Ortiz P., Hermosin B., Cañaveras J.C., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez C. 2012. The biogeochemical role of Actinobacteria in Altamira Cave, Spain. *FEMS Microbiology Ecology*, 81: 281–290
- Culligan B., Sleator R.D., Marchesi J.R., Hill C. 2014. Metagenomics and novel gene discovery: Promise and potential for novel therapeutics. *Virulence*, 5, 3: 399–412
- Culver D.C., Pipan T. 2009. The biology of caves and other subterranean habitats. New York City, Oxford University Press Inc.: 23–40
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. 2011. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, doi: 10.1093/bioinformatics/btr088: 2 str.
- Davies J., Davies D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74, 3: 417–433

- Delmont T.O., Robe P., Clark I., Simonet P., Vogel T.M. 2011. Metagenomic comparison of direct and indirect soil DNA extraction approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 86: 397–400
- Duangmal K., Mingma R., Pathom-aree W., Niyomvong N., Inahashi Y., Matsumoto A., Thamchaipenet A., Takahashi Y. 2012. *Microbispora thailandensis* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil. *Journal of Antibiotics*, 10: 491–494
- Eberhart B., Cross D.F., Chase L.R. 1964. β -glucosidase system of *Neurospora crassa* I. β -glucosidase and cellulase activities of mutant and wild-type strains. *Journal of Bacteriology*, 87: 761–770
- Ekkers D.M., Cretoiu M.S., Kielak A.M., van Elsas J.D. 2012. The great screen anomaly – a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 1005–1020
- Epicentre. 2012a. CopyControl™ fosmid library production kit with pCC1FOS™ vector with pCC1FOS™ vector and phage T-1 resistant EPI300™-T1^R *E. coli* plating strain, Cat. No. CCFOS110. Madison, Epicentre: 31 str.
<http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/copycontrol-fosmid-library-production-kit-with-pcc1fos-vector.pdf?sfvrsn=6> (januar 2015)
- Epicentre. 2012b. EZ-Tn5™ custom transposome construction kits, Cat. No. TNP10622/TNP10623. Madison, Epicentre: 17 str.
<http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/ez-tn5-custom-transposome-construction-kits.pdf?sfvrsn=8> (januar 2015)
- Eustáquio A.S., McGlinchey R.P., Liu Y., Hazzard C., Beer L.L., Florova G., Alhamadsheh M.M., Lechner A., Kale A.J., Kobayashi Y., Reynolds K.A., Moore B.S. 2009. Biosynthesis of the salinosporamide A polyketide synthase substrate chloroethylmalonyl-coenzyme A from S-adenosyl-L-methionine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 30: 12295–12300
- Faber K. 2011. *Biotransformations in organic chemistry: A textbook*. 6th ed. London, Springer: 1–27
- Fatima F., Pathak N., Rastogi Verma S. 2014. An improved method for soil DNA extraction to study the microbial assortment within rhizospheric region. *Molecular Biology International*, 2014: ID 518960, doi:10.1155/2014/518960: 6 str.
- Field D., Garrity G., Gray T., Morrison N., Selengut J., Sterk P., Tatusova T., Thomson N., Allen M.J., Angiuoli S.V., Michael Ashburner11, Axelrod N., Baldauf S., Ballard S., Boore J., Cochrane G., Cole J., Dawyndt P., De Vos P., dePamphilis C., Edwards R., Faruque N., Robert Feldman R., Gilbert J., Gilna P., Glöckner F.O., Goldstein P., Guralnick R., Haft D., Hancock D., Hermjakob H., Hertz-Fowler C., Hugenholtz P., Joint I., Kagan L., Matthew Kane, Kennedy J., Kowalchuk G., Kottmann R., Kolker E., Kravitz S., Kyrpides N., Leebens-Mack J., Lewis S.E., Li K., Lister A.L., Lord P., Maltsev N., Markowitz V., Martiny J., Methe B., Mizrachi I., Moxon R., Nelson K., Parkhill J., Proctor L., White O., Sansone S.A., Spiers A., Stevens R., Swift P., Taylor C., Tateno Y., Tett A., Turner S., Ussery D., Vaughan B., Ward N., Whetzl T., Gil I.S., Wilson G., Wipat A. 2008. The minimum information about a genome sequence (MIGS) specification. *Nature Biotechnology*, 26, 5: 541–547
- Finn R.D., Clements J., Eddy S.R. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Research*, 39: W29–W37, doi: 10.1093/nar/gkr367

- Fu Y., Ibrahim A.S., Fonzi W., Zhou X., Ramos C.F., Mahmoud A. Ghannoum M.A. 1997. Cloning and characterization of a gene (LIPI) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology*, 143: 331–340
- Gabor E.M., Alkema W.B.L., Janssen D.B. 2004. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environmental Microbiology*, 6, 9: 879–886
- Gadakh B., Van Aerschot A. 2015. Renaissance in antibiotic discovery: Some novel approaches for finding drugs to treat bad bugs. *Current Medicinal Chemistry*, 22, 18: 2140–2158
- Gaisser S., Trefzer A., Stockert S., Kirschning A., Bechthold A. 1997. Cloning of an avilamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* Tu57. *Journal of Bacteriology*, 179, 20: 6271–6278
- Gaitatzis N., Silakowski B., Kunze B., Nordsiek G., Blöcker H., Höfle G., Müller R. 2002. The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel type of modular polyketide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 15: 13082–13090
- Gerhardt A., Cinkaya I., Linder D., Huisman G., Buckel W. 2000. Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA. *Archives of Microbiology*, 174, 3: 89–99
- Groth I., Schumann P., Schütze B., Augsten K., Kramer I., Stackebrandt E. 1997. *Beutenbergia cavernae* gen. nov., sp. nov., an L-lysine-containing actinomycete isolated from a cave. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 1733–1740
- Groth I., Schumann P., Schütze B., Augsten K., Stackebrandt E. 2002. *Knoellia sinensis* gen. nov., sp. nov. and *Knoellia subterranea* sp. nov., two novel actinobacteria isolated from a cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 77–84
- Hamid R., Khan M.A., Ahmad M., Ahmad M.M., Abdin M.Z., Musarrat J., Javed S. 2013. Chitinases: An update. *Journal of Pharmacy and BioAllied Science*, 5, 1: 21–29
- Heery D.M., Powell R., Gannon F., Dunican L.K. 1989. Curing of a plasmid from *E. coli* using high-voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 17, 23: 10131–10131
- Herzog Velikonja B., Tkavc R., Pašić L. 2014. Diversity of cultivable bacteria involved in the formation of microbial colonies (cave silver) on the walls of a cave in Slovenia. *International Journal of Speleology*, 43, 1: 45–56
- Hjort K., Presti I., Elväng A., Marinelli F., Sjöling S. 2014. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6: 2819–2828
- Holmes A.J., Costello A., Lidstrom M.E., Murrell J.C. 1995. Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS Microbiology Letters*, 132, 3: 203–208
- Huber T., Faulkner G., Hugenholtz P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments. *Bioinformatics*, 20, 14: 2317–2319
- Ikeda H., Nonomiya T., Usami M., Ohta T., Omura S. 1999. Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide anthelmintic macrolide avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Biochemistry*, 96, 17: 9509–9514

- Iqbal H.A., Craig J.W., Brady S.F. 2014. Antibacterial enzymes from the functional screening of metagenomic libraries hosted in *Ralstonia metallidurans*. FEMS Microbiology Letters, 354, 1: 19–26
- Jurado V., Boiron P., Kroppenstedt R.M., Laurent F., Couble S., Laiz L., Klenk H., González J.M., Saiz-Jimenez C., Mouniée D., Bergeron E., Rodríguez-Nava V. 2008. *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira cave, Cantabria, Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58: 2210–2214
- Jurado V., Gonzalez J.M., Laiz L., Saiz-Jimenez C. 2006. *Aurantimonas altamirensis* sp. nov., a member of the order Rhizobiales isolated from Altamira Cave. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 2583–2585
- Jurado V., Groth I., Gonzalez J.M., Laiz L., Saiz-Jimenez C. 2005a. *Agromyces salentinus* sp. nov. and *Agromyces neolithicus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 153–157
- Jurado V., Groth I., Gonzalez J.M., Laiz L., Saiz-Jimenez C. 2005b. *Agromyces subbeticus* sp. nov., isolated from cave in southern Spain. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 1897–1901
- Jurado V., Kroppenstedt R.K., Saiz-Jimenez C., Klenk H., Delphine Mouniée D., Laiz L., Couble A., Pötter G., Boiron P., Rodríguez-Nava V. 2009. *Hoyosella altamirensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the order Actinomycetales isolated from a cave biofilm. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59: 3105–3110
- Juturu V., Wu J.C. 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. Biotechnology Advances, 30, 6: 1219–1227
- Kasana C.K., Salwan R., Dhar H., Dutt S. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. Current Microbiology, 57, 5: 503–507
- Katoh K., Frith M.C. 2012. Adding unaligned sequences into an existing alignment using MAFFT and LAST. Bioinformatics, 28, 23: 3144–3146
- Katoh K., Standley D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution, 30, 4: 772–780
- Kauffmann I., Schmidt-Dannert C. 2001. Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design. Protein Engineering, Design and Selection, 14, 11: 919–928
- Keller M.W., Schut G.J., Lipscomb G.L., Menon A.L., Iwuchukwu I.J., Leuko T.T., Thorgersen M.P., Nixon W.J., Hawkins A.S., Kelly R.M., Adams M.W.W. 2013. Exploiting microbial hyperthermophilicity to produce an industrial chemical, using hydrogen and carbon dioxide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110, 15: 5840–5845
- Keller U., Lang M., Crnovcic I., Pfennig F., Schauwecker F. 2010. The actinomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: a genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry. Journal of Bacteriology, 192, 10: 2583–2595
- Kent W.J. 2002. BLAT – The BLAST-Like Alignment Tool. Genome Research, 12, 4: 656–664

- Kim C., Fujiyama A., Saitou N. 2003. Construction of a gorilla fosmid library and its PCR screening system. *Genomics*, 82: 571–574
- Kim E.J., Angell S., Janes J., Watanabe C.M. 2008. Estimating P-coverage of biosynthetic pathways in DNA libraries and screening by genetic selection: biotin biosynthesis in the marine microorganism *Chromohalobacter*. *Molecular BioSystems*, 4: 606–613
- Kim M., Lee K., Yoon S., Kim B., Chun J., Yi H. 2013. Analytical tools and databases for metagenomics in the next-generation sequencing era. *Genomics & Informatics*, 11, 3: 102–113
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J. 2012. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 716–721
- Klotz M.G., Schmid M.C., Strous M., op den Camp H.J.M., Jetten M.S.M., Hooper A.B. 2008. Evolution of an octahaem cytochrome c protein family that is key to aerobic and anaerobic ammonia oxidation by bacteria, *Environmental Microbiology*, 10: 3150–3158
- Komac M., Urbanc J. 2013. Model stopnje zakraselosti za območje Slovenije. *Ujma*, 27: 203–207
- Kovač P. 1971. Izolati heterotrofnih bakterij z organskih prevlek na stenah Planinske jame. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo: 30 str.
- Krisch J., Takó M., Papp T., Vágvölgyi C. 2010. Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. V: Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology. Vol. 2. Méndez-Vilas (ed.). Barcelona, Formatex Research Center: 891–896
- Kumar S., Mathur A., Singh V., Nandy S., Khare S.K., Negi S. 2012. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresource Technology*, 120: 300–304
- Lam K.N., Charles T.C. 2015. Strong spurious transcription likely contributes to DNA insert bias in typical metagenomic clone libraries. *Microbiome*, 3: 22, doi: 10.1186/s40168-015-0086-5: 11 str.
- Lee N.M., Meisinger D.B., Aubrecht R., Kovacik L., Saiz-Jimenez C., Baskar S., Baskar R., Liebl W., Porter M.L., Summers Engel A. 2012. Caves and karst environments. V: Life at extremes: Environments, organisms and strategies for survival. Bell E.M. (ed.). Cambridge, CABI: 320–345
- Lee S.D. 2006a. *Amycolatopsis jejuensis* sp. nov. and *Amycolatopsis halotolerans* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a natural cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 549–553
- Lee S.D. 2006b. *Actinocorallia cavernae* sp. nov., isolated from a natural cave in Jeju, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1085–1088
- Lee S.D. 2006c. *Nocardia jejuensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a natural cave on Jeju Island, Republic of Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 559–562
- Lee S.D. 2008. *Jiangella alkaliphila* sp. nov., an actinobacterium isolated from a cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 1176–1179

- Lee S.D. 2013a. *Humibacter antri* sp. nov., an actinobacterium isolated from a natural cave, and emended description of the genus *Humibacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 4315–4319
- Lee S.D. 2013b. *Spelaieicoccus albus* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from a natural cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 3958–3963
- Lee S.G., Choi S.L., Rha E., Song J.J. 2014. Metagenome-derived alkaline phosphatase. Patent No. US 8,647,854 B2: 23 str.
- Letunic I., Bork P. 2011. Interactive Tree Of Life v2: online annotation and display of phylogenetic trees made easy. *Nucleic Acids Research*, 39: W475–W478, doi:10.1093/nar/gkr201
- Li Q., Yi L., Marek P., Iverson B.L. 2013. Commercial proteases: Present and future. *FEBS Letters*, 587: 1155–1163
- Li S., Yang X., Yang S., Zhu M., Wang X. 2012. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2, 3: e201209017, doi: http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201209017: 11 str.
- Liu N., Yan X., Zhang M., Xie L., Wang Q., Huang Y., Zhou X., Wang S., Zhou Z. 2011. Microbiome of fungus-growing termites: a new reservoir for lignocellulase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1: 48–56
- Lodhi G., Kim Y., Hwang J., Kim S., Jeon Y., Je J., Ahn C., Moon S., Jeon B., Park P. 2014. Chitooligosaccharide and its derivatives: Preparation and biological applications. *BioMed Research International*, 2014: e654913, doi: 10.1155/2014/654913: 13 str.
- López-López O., Cerdán M.E., González Siso M.I. 2014. New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. *Current Protein and Peptide Science*, 15: 445–455
- Lucigen Corporation. 2015. CopyRight® v2.0 fosmid cloning kits. Middleton, Lucigen Corporation: 17 str.
<https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA027-CopyRight2-pSMART-FOS.pdf>
 (januar 2015)
- Maciejewska M., Stelmach Pessi I., Arguelles-Arias A., Noirfalise P., Luis G., Ongena M., Barton H., Carnol M., Rigali S. 2015. *Streptomyces lunaelactis* sp. nov., a novel ferroverdin A-producing *Streptomyces* species isolated from a moonmilk speleothem. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 2: 519–531
- Margesin R., Schumann P., Cathrin Spröer C., Gounot A. 2004. *Arthrobacter psychrophenicus* sp. nov., isolated from an alpine ice cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 2067–2072
- Markowitz V.M., Chen I.A., Palaniappan K., Chu K., Szeto E., Pillay M., Ratner A., Huang J., Woyke T., Huntemann M., Anderson I., Billis K., Varghese N., Mavromatis K., Pati A., Ivanova N.N., Kyrpides N.C. 2013. IMG 4 version of the integrated microbial genomes comparative analysis system. *Nucleic Acids Research*, 42, D1: D560–D567, doi: 10.1093/nar/gkt963
- Martin J.F. 1992. Clusters of genes for the biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 2: 73–90
- Matsen F.A., Kodner R.B., Armbrust E.V. 2010. pplacer: linear time maximum-likelihood and Bayesian phylogenetic placement of sequences onto a fixed reference tree. *BMC Bioinformatics*, 11: 538, doi:10.1186/1471-2105-11-538: 16 str.

- Mavromatis K., Natalia N. Ivanova, Chen I.A., Szeto E., Markowitz V.M., Kyrpides N.C. 2009. The DOE-JGI standard operating procedure for the annotations of microbial genomes. *Standards in Genomic Science*, 1: 63–67
- Megušar F., Sket B., 1973: On the nature of some organic covers on the cave walls. V: *Proceedings of the 6th international congress of speleology. Olomouc 1973. Vol. 5.* Panoš V. (ed.). Praha, Academia: 159–161
- Merela M., Kregar V., Čekada M., Bračič R., Hribernik M., Ilič U., Bakšič D., Novosel D. 2013. Jamarstvo v Sloveniji in na Hrvaškem. Ljubljana, Jamarska zveza Slovenije, Jamarska reševalna služba: 66 str.
http://www.eu-proteus.eu/documents/publicity/Caving_in_Slovenia_and_Croatia_EU_Proteus.pdf (januar 2015)
- Merlak D. 1975. *Proactinomyces spelaeophilus* v Planinski jami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo: 57 str.
- Mótyán J.A., Tóth F., Tózsér J. 2013. Research applications of proteolytic enzymes in molecular biology. *Biomolecules*, 3: 923–942
- Nakaew N., Sungthong R., Yokota A., Lumyong S. 2012. *Nonomuraea monospora* sp. nov., an actinomycete isolated from cave soil in Thailand, and emended description of the genus *Nonomuraea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 3007–3012
- Nowak-Thompson B., Chaney N., Wing J.S., Gould S.J., Loper J.E. 1999. Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*, 181, 7: 2166–2174
- Okamoto S., Taguchi T., Ochi K., Ichinose K. 2009. Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: Discovery of alternative routes for quinone formation encoded in the act gene cluster. *Chemistry & Biology*, 16, 2: 226–236
- Ortiz M., Legatzki A., Neilson J.W., Frysliie B., Nelson W.M., Wing R.A., Soderlund C.A., Pryor B.M., Maier R.M. 2014. Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. *The ISME Journal*, 8: 478–491
- Ortiz M., Neilson J.W., Nelson W.M., Legatzki A., Byrne A., Yu Y., Wing R.A., Soderlund C.A., Pryor B.M., Pierson L.S., Maier R.M. 2013. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner caverns, AZ. *Microbial Ecology*, 65, 2: 371–383
- Pang M., Abdullah N., Lee C., Ng C. 2008. Isolation of high molecular weight DNA from forest topsoil for metagenomic analysis. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 16, 2: 35–41
- Pangerčič A., Papić B., Pašić L. 2014. Genetic diversity and distribution of hydrolase genes in cave environments as depicted by analysis of available genomic and metagenomic sequences. V: *4th Colloquium of Genetics, Piran, September 19th 2014.* Ramšak A., Potočnik U. (eds.). Ljubljana, Genetic Society of Slovenia: 83–83
- Parsley L.C., Linneman J., Goode A.M., Becklund K., George I., Goodman R.M., Lopanik N.L., Liles M.R. 2011. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil Acidobacteria. *FEMS Microbiology and Ecology*, 78, 1: 176–187

- Pašić L., Kovče B., Sket B., Herzog-Velikonja B. 2010. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology and Ecology*, 71, 1: 50–60
- Pašić L., Mulaomerović J. 2014. Microorganisms and the natural heritage of Dinaric karst – a review. V: *The conservation of subterranean cultural heritage*. Saiz-Jimenez C. (ed.). London, Taylor & Francis Group: 257–265
- Porca E., Jurado V., Žgur-Bertok D., Saiz-Jimenez C., Pašić L. 2012. Comparative analysis of yellow microbial communities growing on the walls of geographically distinct caves indicates a common core of microorganisms involved in their formation. *FEMS Microbiology and Ecology*, 81, 1: 255–266
- Pride D.T., Meinersmann R.J., Wassenaar T.M., Blaser M.J. 2003. Evolutionary implications of microbial genome tetranucleotide frequency biases. *Genome Research*, 13, 2: 145–158
- Privé F., Newbold J., Kaderbhai N.N., Girdwood S.G., Golyshina O.V., Golyshin P.N., Scollan N.D., Huws S.A. 2015. Isolation and characterization of novel lipases/esterases from a bovine rumen metagenome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 13: 5475–5485
- Quail M.A., Matthews L., Sims S., Lloyd C., Beasley H., Baxter S.W. 2011. Genomic libraries: Construction and screening of fosmid genomic libraries. V: *Molecular methods for evolutionary genetics (Methods in molecular biology, 722)*. Orgogozo V., Rockman M.V. (eds.). New York, Humana Press: 37–58
- Rajan A., Soban Kumar D.R., Nair A.J. 2011. Isolation of a novel alkaline lipase producing fungus *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 from aged and crude rice bran oil and quantification by HPTLC. *International Journal of Biological Chemistry*, 5, 2: 116–126
- Ray A. 2012. Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmacy and Technology*, 2, 2: 33–37
- Reeves A.R., English R.S., Lampel J.S., Post D.A., Vanden Boom T.J. 1999. Transcriptional organization of the erythromycin biosynthetic gene cluster of *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of Bacteriology*, 181, 22: 7098–7106
- Rondon R.M., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., Macneil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J., Goodman R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 6: 2541–2547
- Rose T.M., Schultz E.R., Henikoff J.G., Pietrokovski S., McCallum C.M., Henikoff S. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Research*, 26, 7: 1628–1635
- Rosen G.L., Reichenberger E.R., Aaron M., Rosenfeld A.M. 2011. NBC: the Naïve Bayes Classification tool webserver for taxonomic classification of metagenomic reads. *Bioinformatics*, 27, 1: 127–129
- Sathya T.A., Khan M. 2014. Diversity of glycosyl hydrolase enzymes from metagenome and their application in food industry. *Journal of Food Science*, 79, 11: 2149–2156
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., F. Weber C.F. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-

- independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 23: 7537–7541
- Seidman C.E. 2005. Basic protocol 1: Transformation using calcium chloride. UNIT 1.8: Introduction of plasmid DNA into cells. *Current Protocols in Molecular Biology*, doi: 10.1002/0471142727.mb0108s37: U 1.8.1–1.8.10
- Seo J.P., Yun Y., Dong Lee S.D. 2007. *Nocardia speluncae* sp. nov., isolated from a cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2932–2935
- Shah A.A., Kato S., Shintani N., Kamini N.R., Nakajima-Kambe T. 2014. Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8: 3437–3447
- Shen B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7: 285–295
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7, 549: doi:10.1038/msb.2011.75: 6 str.
- Silvestro D., Michalak I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*, 12, 4: 335–337
- Singh R., Gupta N., Goswami V.K., Gupta R. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 6: 679–682
- Sørensen A., Lübeck M., Lübeck P.S., Ahring B.K. 2013. Fungal beta-glucosidases: A bottleneck in industrial use of lignocellulosic materials. *Biomolecules*, 3, 3: 612–631
- Staley J., Konopka A. 1985. Measurement of *in situ* activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39: 321–346
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 9: 1312–1313
- Stark M., Berger S.A., Stamatakis A., von Mering C. 2010. MLTreeMap – accurate Maximum Likelihood placement of environmental DNA sequences into taxonomic and functional reference phylogenies. *BMC Genomics*, 11: 461, doi: 10.1186/1471-2164-11-461: 11 str.
- Sundarram A., Murthy T.P.K. 2014. α -amylase production and applications: A review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, 2, 4: 166–175
- Sungthong R., Nakaew N. 2014. The genus *Nonomuraea*: A review of a rare actinomycete taxon for novel metabolites. *Journal of Basic Microbiology*, 54: 1–14
- Tabita F.R., Hanson T.E., Li H., Satagopan S., Singh J., Chan S. 2007. Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 4: 576–599
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 12: 2725–2729
- Tang P., Chiu C. 2010. Metagenomics for the discovery of novel human viruses. *Future Microbiology*, 5, 2: 177–189
- Teather R.M., Wood P.J. 1982. Use of Congo red–polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 4: 777–780

- Temperton B., Field D., Oliver A., Tiwari B., Mühling M., Joint I., Gilbert J.A. 2009. Bias in assessments of marine microbial biodiversity in fosmid libraries as evaluated by pyrosequencing. *The ISME Journal*, 3: 792–796
- Thermo Scientific. 2008. NanoDrop 1000 spectrophotometer V3.7 user's manual. Wilmington, Thermo Scientific: 105 str. <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> (januar 2015)
- Thomas T., Gilbert J., Meyer F. 2012. Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2, 3, doi: 10.1186/2042-5783-2-3: 12 str.
- Tomova I., Lazarkevich I., Tomova A., Kambourova M., Vasileva-Tonkova E. 2013. Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *International Journal of Speleology*, 42, 1: 65–76
- Torres-Estupiñan G.G., Barreto-Hernández E. 2014. *In silico* hybridization system for mapping functional genes of soil microorganism using next generation sequencing. V: *Advances in Computational Biology (Advances in Intelligent Systems and Computing, 232)*. Castillo E.F. (ed.). Salamanca, Springer International Publishing: 337–345
- Uchiyama T., Miyazaki K. 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 6: 616–622
- Wang H., Fewer D.P., Holm L., Rouhiainen L., Sivonen K. 2014. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 25: 9259–9264
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M., Cole J.R. 2007. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 16: 5261–5267
- Weissman K.J. 2009. Introduction to polyketide biosynthesis. V: *Complex enzymes in microbial natural product biosynthesis, Part B: Polyketides, aminocoumarins and carbohydrates*. Methods in enzymology, 458. Hopwood D.A. (ed.). London, Academic Press: 3–16
- Wen Y., Wu X., Teng Y., Qian C., Zhan Z., Zhao Y., Li O. 2011. Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69. *Environmental Microbiology*, 13, 10: 2726–2737
- Wilke A., Glass E.M., Bischof J., Braithwaite D., Souza M.D., Gerlach W., Harrison T., Kevin Keegan, Matthews H., Paczian T., Wei Tang, Trimble W.L., Wilkening J., Desai N., Meyer F. 2013. MG-RAST. Technical report and manual for version 3.3.6 – rev. 1. Chicago, University of Chicago: 115 str.
ftp://ftp.metagenomics.anl.gov/data/manual/mg-rast-tech-report-v3_r1.pdf (januar 2015)
- Wu M., Eisen J.A. 2008. A simple, fast, and accurate method of phylogenomic inference. *Genome Biology*, 9: R151, doi:10.1186/gb-2008-9-10-r151: 11 str.
- Wu M., Scott A.J. 2012. Phylogenomic analysis of bacterial and archaeal sequences with AMPHORA2. *Bioinformatics*, 28, 7: 1033–1034
- Zeller G., Tap J., Voigt A.Y., Sunagawa S., Kultima J.R., Costea P.I., Amiot A., Böhm J., Brunetti F., Habermann N., Hercog R., Koch M., Luciani A., Mende D.R., Schneider

- M.A., Schrotz-King P., Tournigand C., Tran Van Nhieu J., Yamada T., Zimmermann J., Benes V., Kloor M., Ulrich C.M., von Knebel Doeberitz M., Sobhani I., Bork P. 2014. Potential of fecal microbiota for early-stage detection of colorectal cancer. *Molecular Systems Biology*, 10: 766, doi: 10.15252/msb.20145645: 18 str.
- Zhou J., He Z., Yang Y., Deng Y., Tringe S.G., Alvarez-Cohen L. 2015. High-throughput metagenomic technologies for complex microbial community analysis: Open and closed formats. *mBio*, 6, 1: e02288-14, doi:10.1128/mBio.02288-14: 17 str.
- Ziemert N., Podel S., Penn K., Badger J.H., Allen E., Jensen P.R. 2012. The Natural Product Domain Seeker NaPDoS: A phylogeny based bioinformatic tool to classify secondary metabolite gene diversity. *PLOS ONE*, 7, 3: e34064, doi: 10.1371/journal.pone.0034064: 9 str.
- Zupančič L., Zorec M., Pašić L. 2014. Are subterranean microbes true cave dwellers? A survey on microbial habitability. V: 4th Colloquium of Genetics, Piran, September 19th 2014. Ramšak A., Potočnik U. (eds.). Ljubljana, Genetic Society of Slovenia: 87–87

ZAHVALA

Najprej se najlepše zahvaljujem družini za vso ljubezen, podporo in pomoč skozi ves čas izdelave magistrskega dela.

Velika zahvala gre mentorici doc. dr. Lejli Pašić za pomoč in nasvete pri izdelavi magistrskega dela. Srečen sem, da sem našel mentorico, ki jo veseliyo tako podobne stvari kot mene samega, in ki me ni nikoli ovirala pri moji raziskovalni radovednosti.

Hvala somentorici doc. dr. Blagajani Herzog Velikonja za temeljit pregled magistrskega dela. Prav tako se zahvaljujem recenzentu doc. dr. Blažu Stresu za temeljit pregled in konstruktivne kritike svojega dela.

Hvala vsem mojim prijateljem, ki so mi tekom izdelave magistrskega dela stali ob strani. Hvala kolegom za popestritev dni v laboratoriju. Maja, Daša, Aleksandra, Katja, Patricia in Matevž, brez vas bi bili moji dnevi v laboratoriju precej manj zanimivi. Na koncu gre zahvala še vsem, ki ste mi kakor koli pomagali pri izvedbi laboratorijskih poizkusov, še posebej tehnikoma Gregorju in Barbari.

Najbolj redki so tisti plezalci, ki se povzpnejo na vrh, kljub temu da dobro vedo za udobno stran na drugi strani gore, a se vseeno niso odločili zanjo.

In na koncu srečanje na vrhu. Tisti, ki je pravkar izstopil iz udobnega avtomobila, se izmučenemu plezalcu prav prisrčno nasmehne in mu moli roko v pozdrav. Kaj ni to lepo, reče, da se srečava na isti gori? Toda plezalec ne sprejme ponujene roke. Dolgo molči in nazadnje reče: »To ni ista gora.«

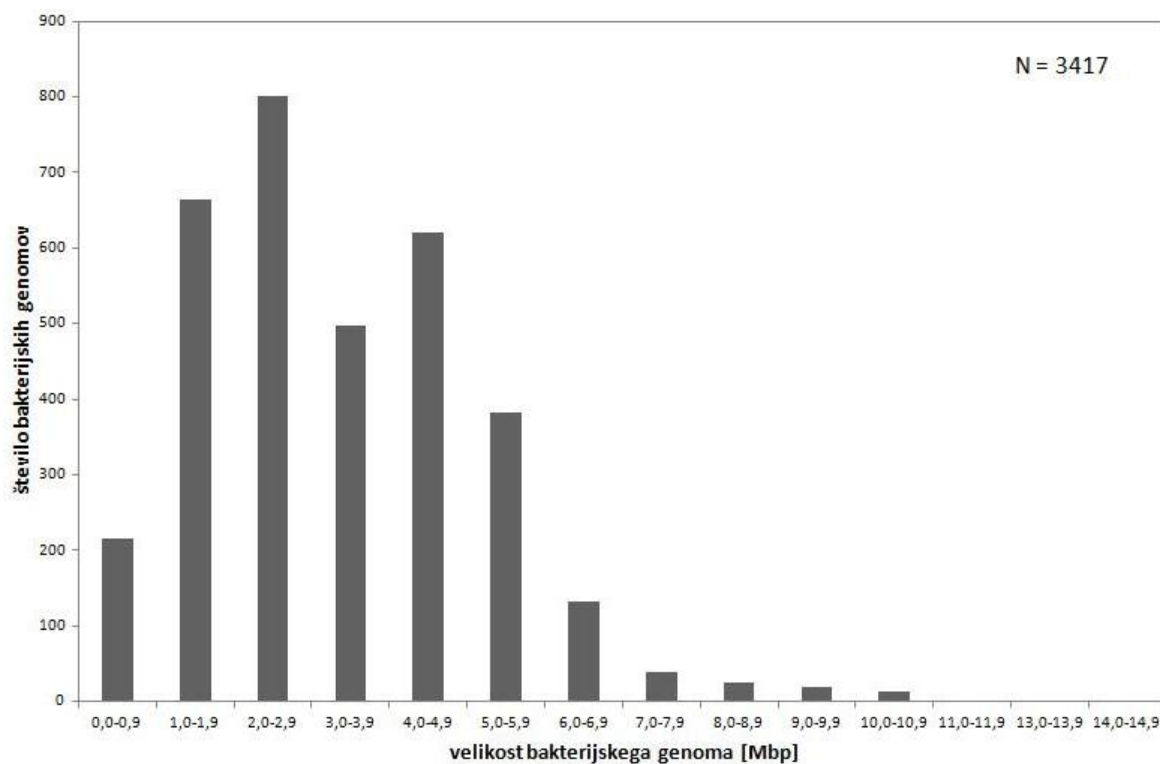
Svetlana Makarovič, Gora

PRILOGE

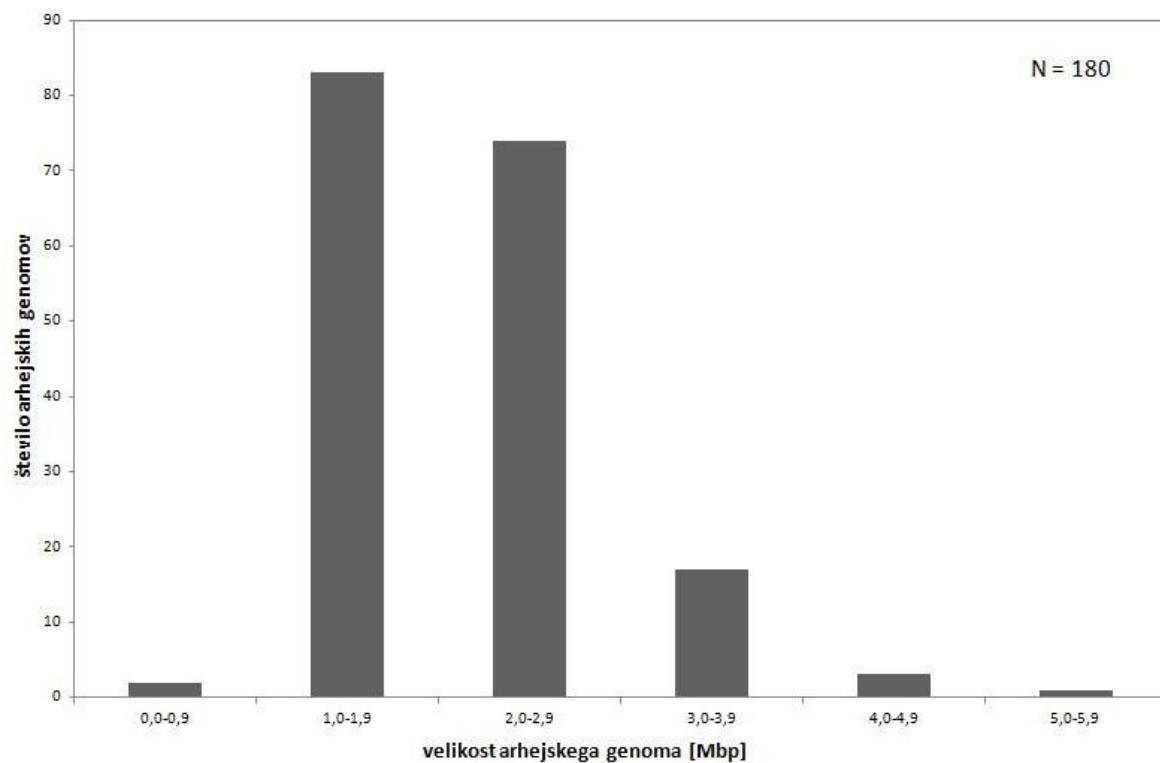
Priloga A: Seznam nekaterih aktinobakterijskih vrst, ki so bile opisane v jamah. V seznam niso vključene nove mikrobne vrste, ki so jih opisali v umetno ustvarjenih votlinah, kot so rudniki in katakombe.

Ime bakterijske vrste	Red	Jama, v kateri so opisali bakterijsko vrsto	Vir
<i>Actinocorallia cavernae</i>	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Lee (2006b)
<i>Agromyces neolithicus</i>	Actinomycetales	Grotta dei Cervi (Italija)	Jurado in sod. (2005a)
<i>Agromyces salentinus</i>	Actinomycetales	Grotta dei Cervi (Italija)	Jurado in sod. (2005a)
<i>Agromyces subbeticus</i>	Actinomycetales	Los Murciélagos (Španija)	Jurado in sod. (2005b)
<i>Amycolatopsis halotolerans</i>	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Lee (2006a)
<i>Amycolatopsis jejuensis</i>	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Lee (2006a)
<i>Arthrobacter psychrophenicus</i>	Actinomycetales	alpska ledena jama (Avstrija)	Margesin in sod. (2004)
<i>Beutenbergia cavernae</i> *	Actinomycetales	Reed Flute Cave (Kitajska)	Groth in sod. (1999)
<i>Hoyosella altamirensis</i> *	Actinomycetales	Altamira (Španija)	Jurado in sod. (2009)
<i>Humibacter antri</i>	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Lee (2013a)
<i>Jiangella alkaliphila</i>	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Lee (2008)
<i>Knoellia sinensis</i> *	Actinomycetales	Reed Flute Cave (Kitajska)	Groth in sod. (2002)
<i>Knoellia subterranea</i> *	Actinomycetales	Reed Flute Cave (Kitajska)	Groth in sod. (2002)
<i>Microbispora thailandensis</i>	Actinomycetales	jama v provinci Nakorn Sawan (Tajska)	Duangmal in sod. (2012)
<i>Microlunatus cavernae</i>	Actinomycetales	Alu Ancient Cave (Kitajska)	Cheng in sod. (2013b)
<i>Nocardia altamirensis</i>	Actinomycetales	Altamira (Španija)	Jurado in sod. (2008)
<i>Nocardia jejuensis</i>	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Lee (2006c)
<i>Nocardia speluncae</i>	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Seo in sod. (2007)
<i>Nonomuraea monospora</i>	Actinomycetales	Pha Tup Cave Forest Park (Tajska)	Nakaew in sod. (2012)
<i>Saccharopolyspora cavernae</i>	Actinomycetales	Yanzi Dong (Kitajska)	Cheng in sod. (2013a)
<i>Spelaecoccus albus</i> *	Actinomycetales	jama na otoku Jeju (Južna Koreja)	Lee (2013b)
<i>Streptomyces lunaelactis</i>	Actinomycetales	Grotte des Collemboles (Belgija)	Maciejewska in sod. (2015)

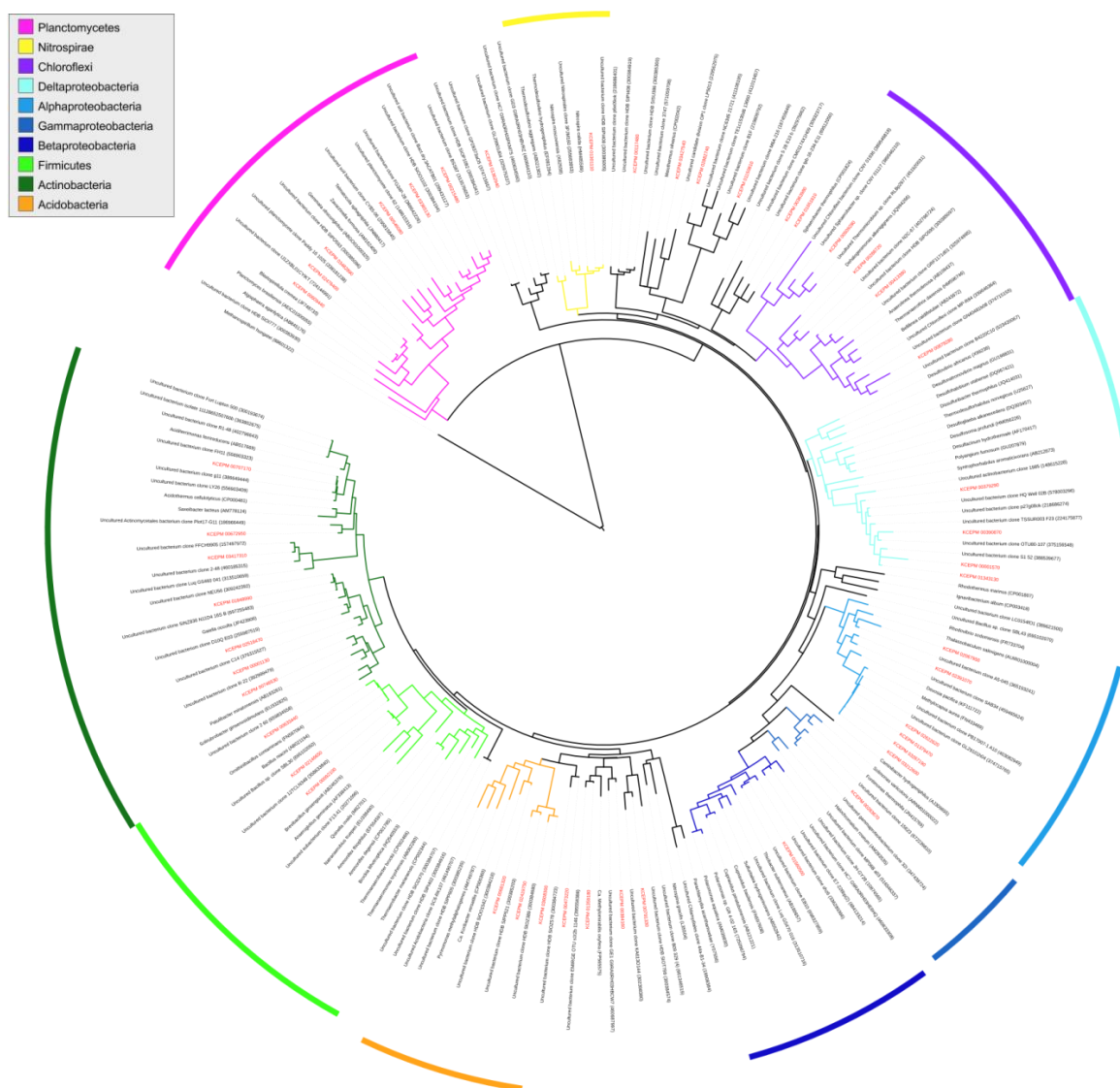
*nova vrsta predstavlja tudi nov rod znotraj reda Actinomycetales



Priloga B: V celoti sekvencirani bakterijski genomi, grupirani glede na njihovo velikost



Priloga C: V celoti sekvencirani arhejski genomi, grupirani glede na njihovo velikost



Priloga D: Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA iz metagenoma »Echo Passage«. Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAXML z uporabo nukleotidnega substitucijskega modela GTR + G in hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*). Kratka metagenomska zaporedja (rdeča barva) smo na referenčno drevo RAXML umestili z algoritmom RAXML EPA. Kot zunanjo skupino smo uporabili arhejo *Methanospirillum hungatei*. Drevo smo koreninili in vizualno uredili s prosto dostopnim spletnim orodjem iTOL (Letunic in Bork, 2011).

Priloga F: Taksonomska uvrstitev arhejskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA z orodji MLTreeMap, RDP Classifier in RAXML EPA. Vsa zaporedja smo umestili do debela natančno, kjer je bilo to mogoče.

Oznaka arhejskega metagenomskega zaporedja 16S rRNA	MLTreeMap	RDP Classifier	RAXML EPA
KCEPM_00053800	Archaea; Euryarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota
KCEPM_00203340	Bacteria; Firmicutes	Archaea; Thaumarchaeota	Archaea; Crenarchaeota
KCEPM_00267820	/	Archaea; Thaumarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota
KCEPM_00306820	Archaea; Euryarchaeota	/	Archaea; Thaumarchaeota
KCEPM_00421830	Archaea; Euryarchaeota	Archaea; Crenarchaeota	Archaea; Euryarchaeota
KCEPM_00463340	Archaea; Crenarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota
KCEPM_00581020	Bacteria; Aquificae	Archaea	Archaea; Euryarchaeota
KCEPM_00602450	Archaea; Crenarchaeota	Archaea	Archaea; Thaumarchaeota
KCEPM_00793480	Archaea	/	Archaea; Thaumarchaeota
KCEPM_01003720	Bacteria	Archaea; Euryarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota
KCEPM_01142010	Archaea; Euryarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota	Archaea; Euryarchaeota
KCEPM_01720010	Archaea; Crenarchaeota	Archaea; Crenarchaeota	Archaea; Euryarchaeota
KCEPM_01992250	Bacteria	Archaea	Archaea; Crenarchaeota
KCEPM_02749840	Archaea; Euryarchaeota	Archaea; Euryarchaeota	Archaea; Euryarchaeota
KCEPM_00534480	Archaea; Euryarchaeota	Archaea; Thaumarchaeota	Archaea; Euryarchaeota

Priloga G: Taksonomska uvrstitev bakterijskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA z orodji MLTreeMap, RDP Classifier in RAxML EPA. Vsa zaporedja smo uvrstili do debela oz. razreda natančno, kjer je bilo to mogoče.

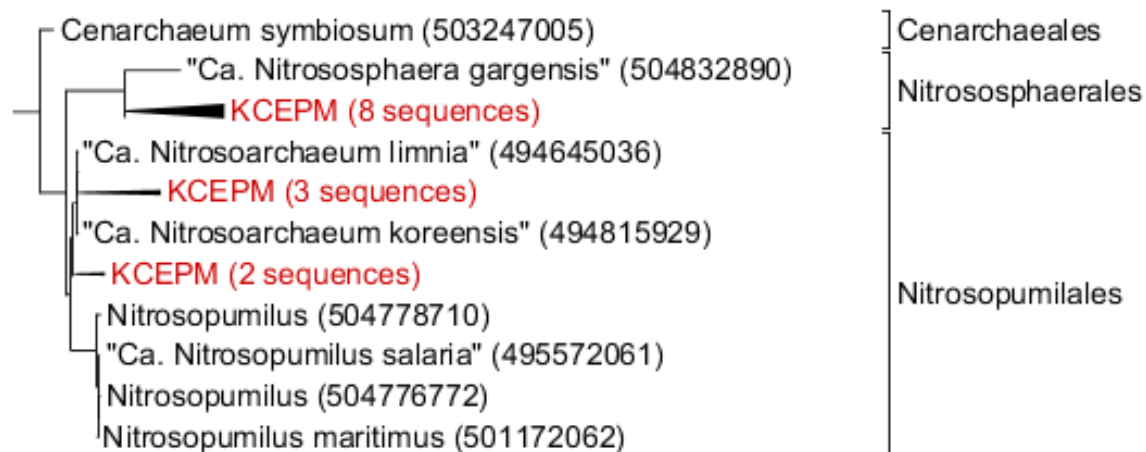
Oznaka bakterijskega metagenomskega zaporedja 16S rRNA	MLTreeMap	RDP Classifier	RAxML EPA
KCEPM_00609440	Bacteria; Firmicutes	Bacteria	Bacteria; Planctomycetes
KCEPM_02476400	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Planctomycetes	Bacteria; Planctomycetes
KCEPM_03482890	/	Bacteria	Bacteria; Planctomycetes
KCEPM_00546080	/	Bacteria	Bacteria; Planctomycetes
KCEPM_03365130	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Planctomycetes	Bacteria; Planctomycetes
KCEPM_00215480	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Planctomycetes	Bacteria; Planctomycetes
KCEPM_01362940	Bacteria	Bacteria	Bacteria
KCEPM_03427540	Bacteria; Firmicutes	Bacteria	Bacteria; Nitrospirae
KCEPM_00117480	/	Bacteria	Bacteria
KCEPM_03427540	Bacteria; Deinococcus–Thermus	Bacteria	Bacteria
KCEPM_02882740	/	Bacteria	Bacteria
KCEPM_01150810	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria	Bacteria
KCEPM_00363980	Bacteria; Firmicutes	Bacteria	Bacteria
KCEPM_01651810	Bacteria	Bacteria	Bacteria
KCEPM_00509280	/	Bacteria	Bacteria; Chloroflexi
KCEPM_00288720	Bacteria; Firmicutes	Bacteria	Bacteria; Chloroflexi
KCEPM_00413380	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Chloroflexi	Bacteria; Chloroflexi
KCEPM_00878280	Bacteria; Firmicutes	Bacteria	Bacteria; Chloroflexi
KCEPM_00379290	Bacteria; Proteobacteria	Bacteria	Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria
KCEPM_00390870	Bacteria; Chloroflexi	Bacteria	Bacteria; Proteobacteria; Bacteria; Deltaproteobacteria
KCEPM_00001570	Bacteria; Firmicutes	Bacteria	Bacteria; Proteobacteria; Bacteria; Deltaproteobacteria
KCEPM_01343130	Bacteria; Deinococcus–Thermus	Bacteria	Bacteria; Proteobacteria Bacteria; Deltaproteobacteria
KCEPM_02067950	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
KCEPM_02391070	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
KCEPM_02622620	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
KCEPM_01379470	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
KCEPM_03267190	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
KCEPM_03212600	Bacteria; Firmicutes	Proteobacteria; Alphaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria
KCEPM_00283670	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria
KCEPM_01560500	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria	Bacteria; Proteobacteria	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria
KCEPM_00791330	Bacteria; Firmicutes	Bacteria	Bacteria
KCEPM_00384160	Bacteria	Bacteria	Bacteria; kandidatno deblo »NC10«
KCEPM_01359180	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria	Bacteria; kandidatno deblo »NC10«

se nadaljuje

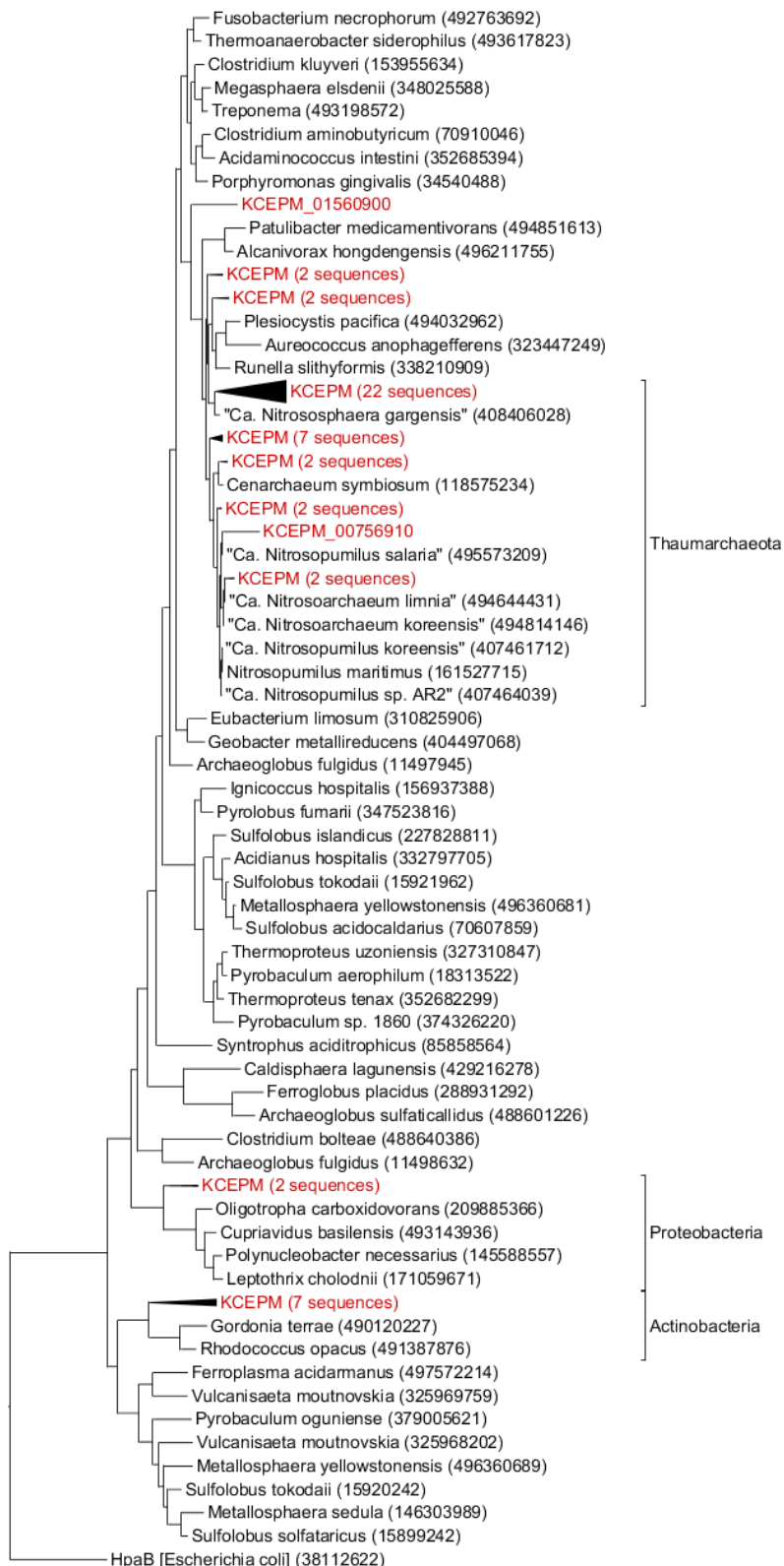
Nadaljevanje Priloge G: Taksonomska uvrstitev bakterijskih metagenomskih zaporedij genov za 16S rRNA z orodji MLTreeMap, RDP Classifier in RAXML EPA. Vsa zaporedja smo uvrstili do debla oz. razreda natančno, kjer je bilo to mogoče.

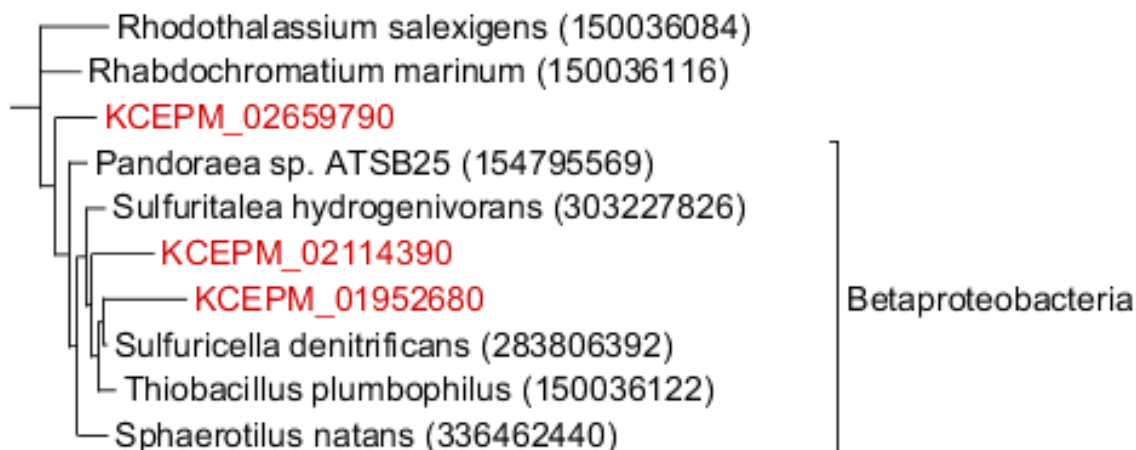
Oznaka bakterijskega metagenomskega zaporedja 16S rRNA	MLTreeMap	RDP Classifier	RAXML EPA
KCEPM_00473220	Bacteria; Acidobacteria	Bacteria	Bacteria
KCEPM_03608300	Bacteria	Bacteria	Bacteria; Acidobacteria
KCEPM_02419750	/	Bacteria	Bacteria; Acidobacteria
KCEPM_00681320	Bacteria; Acidobacteria	Bacteria	Bacteria; Acidobacteria
KCEPM_00092100	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Firmicutes
KCEPM_02146650	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Firmicutes	Bacteria; Firmicutes
KCEPM_00633440	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria	Bacteria; Actinobacteria
KCEPM_00746530	Bacteria	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria
KCEPM_00001130	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria
KCEPM_02518470	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria
KCEPM_01848990	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria
KCEPM_03417310	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria	Bacteria; Actinobacteria
KCEPM_00672950	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria
KCEPM_00707170	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria	Bacteria; Actinobacteria

Priloga H: Filogenetsko drevo taumarhejskih metagenomskih podenot A amonij-monoooksigenaz (AmoA). Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAXML in kratka metagenomska zaporedja (na sliki označena z rdečo barvo) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAXML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + G + F in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).

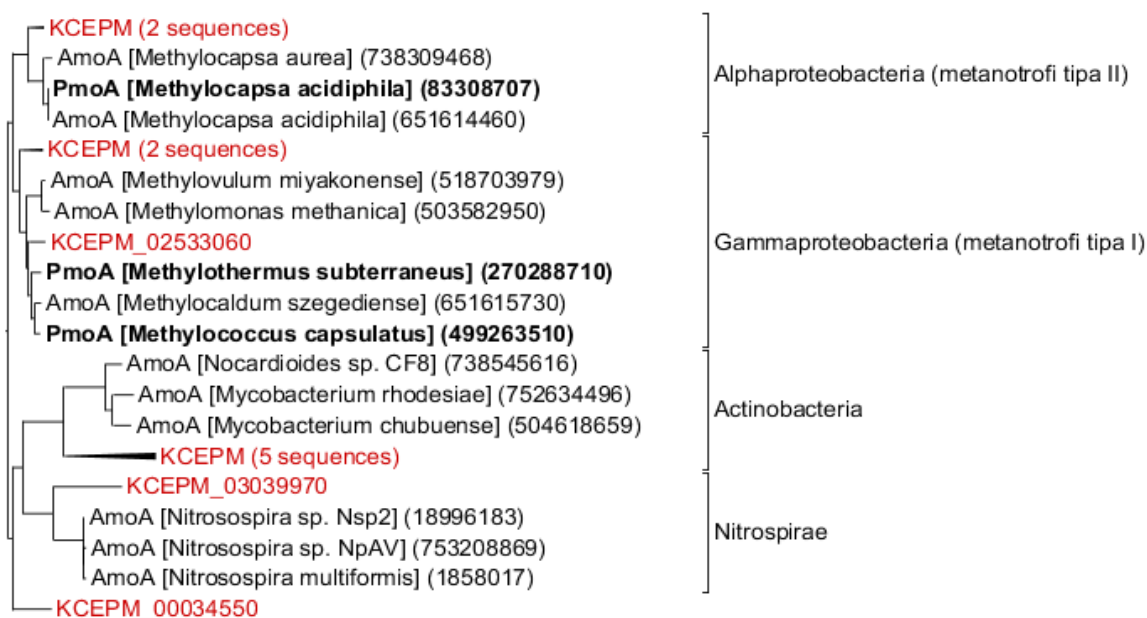


Priloga I: Filogenetsko drevo metagenomskih 4-hidroksibutirat-CoA-dehidratiz (4HBD). Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAXML in kratka metagenomska zaporedja (rdeči tisk) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAXML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + I + G + F in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*). Kot zunanjo skupino smo uporabili protein HpaB bakterije *Escherichia coli*.



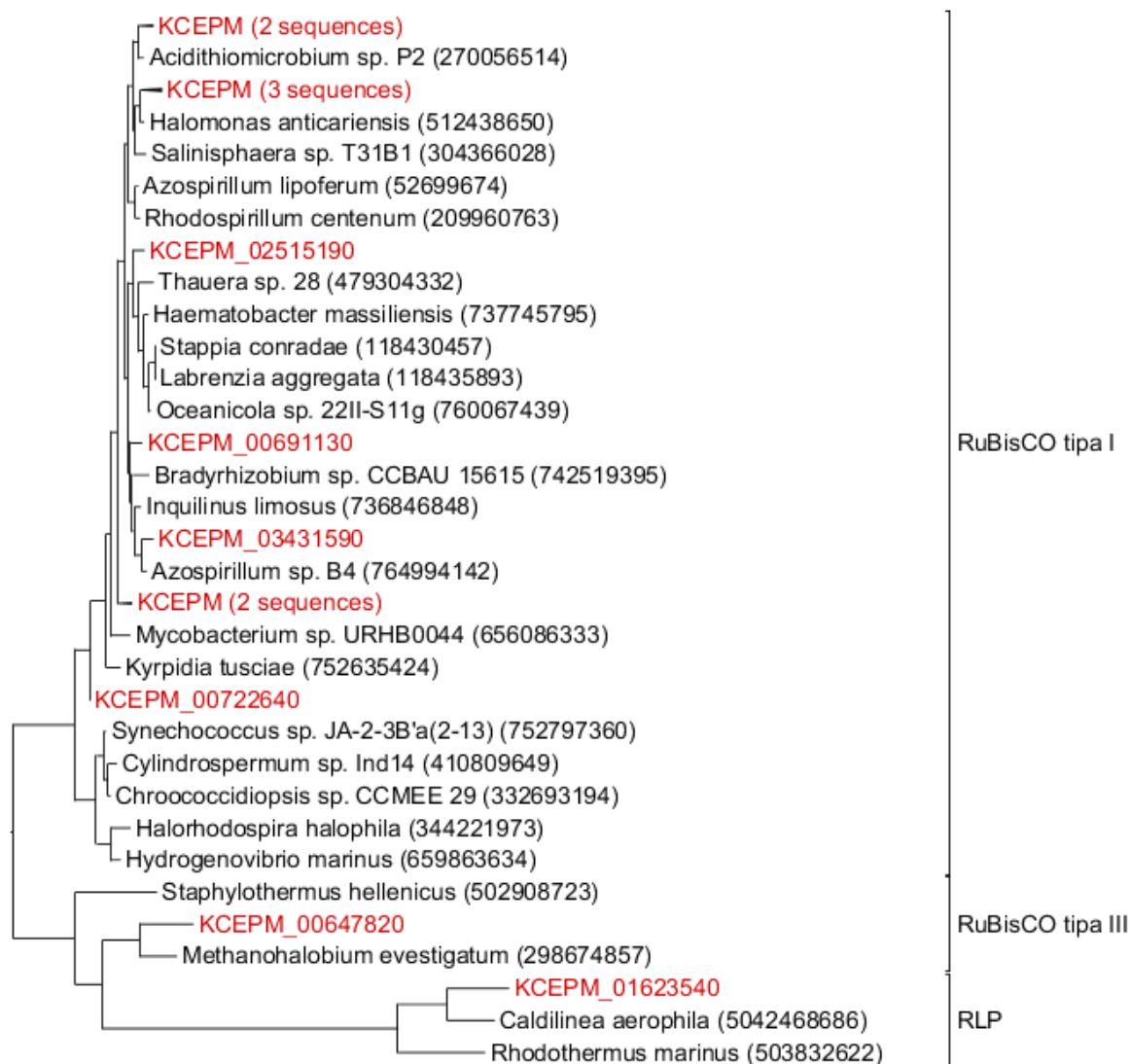


Priloga J: Filogenetsko drevo metagenomskih proteobakterijskih encimov SoxB, udeleženih pri litotrofni oksidaciji reduciranih žveplovih spojin po Sox-poti. Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (rdeči tisk) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + I + G in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).

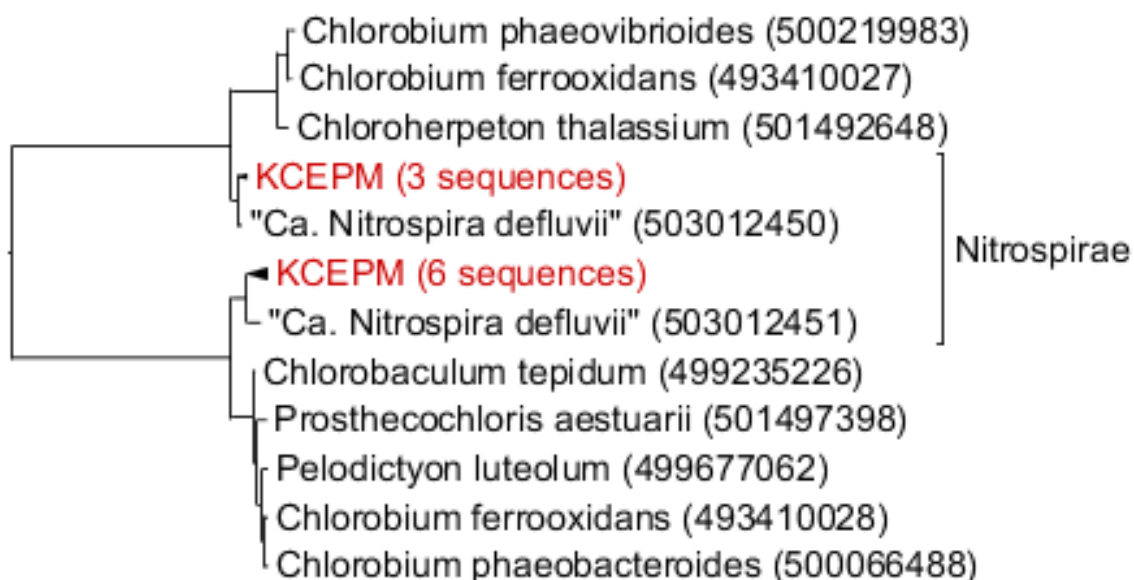


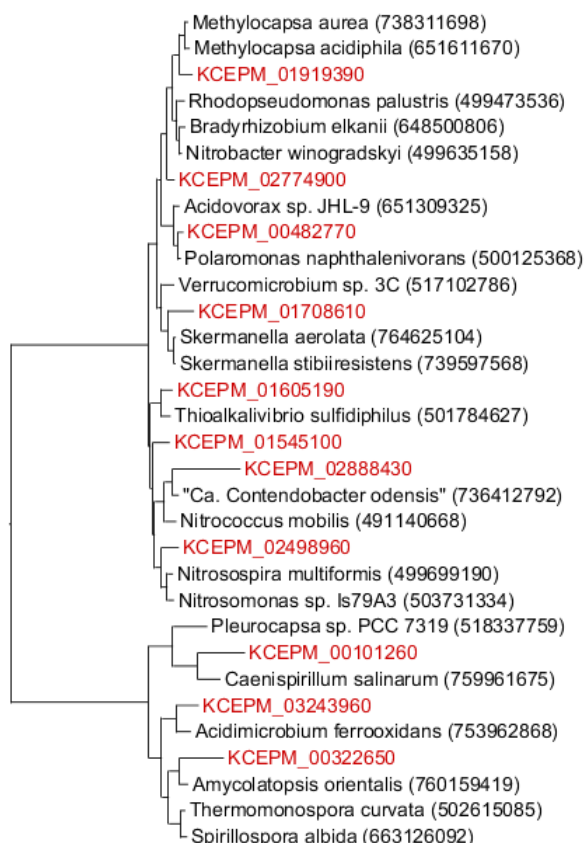
Priloga K: Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih podenot A amonij-monooksigenaz (AmoA) in metan-monooksigenaz (PmoA), udeleženih pri nitrifikaciji (AmoA) in metanotrofiji (PmoA). Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (na sliki označena z rdečo barvo) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + G + F in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).

Priloga L: Filogenetsko drevo velike podenote metagenomskih encimov RuBisCO (CbbL), udeleženih v Calvin-Bensenovem ciklu fiksacije CO₂. Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (rdeči tisk) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + G in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*). RuBisCO, karboksilaza/oksigenaza ribuloza-1,5-bisfosfata; RLP, encimu RuBiSCO podoben protein.



Priloga M: Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih ATP-citrat-liaz (AclB), udeleženih v reduktivnem ciklu trikarboksilnih kislin fiksacije CO₂. Referečno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (rdeči tisk) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + G + F in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).

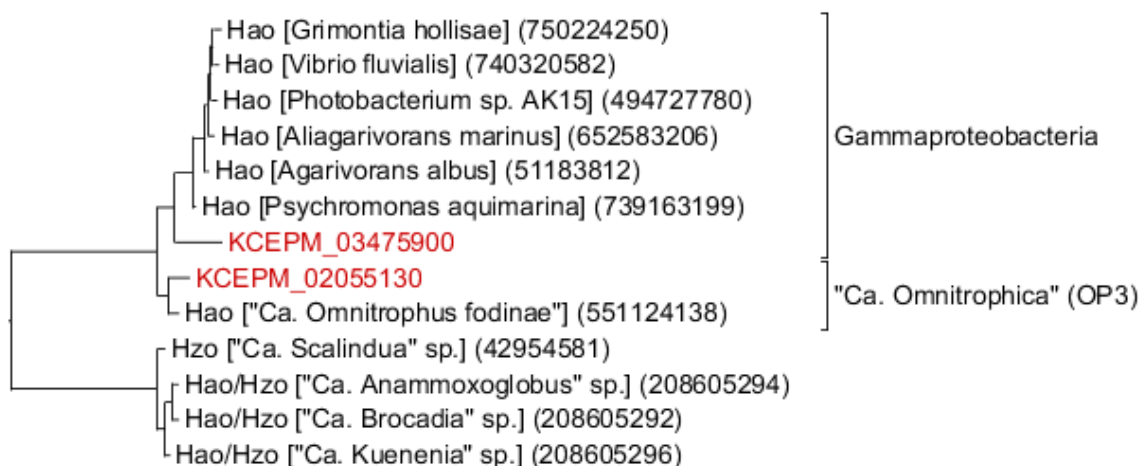




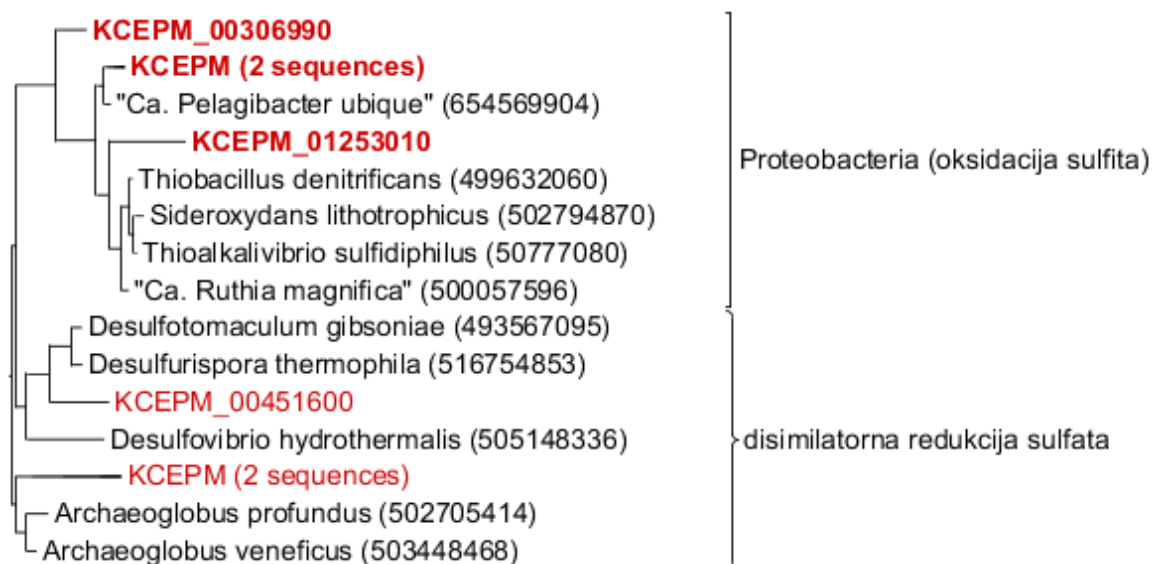
Priloga N: Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih fosforibulokinaz (Prk), udeleženih v Calvin–Bensonovem ciklu fiksacije CO₂. Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (rdeči tisk) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + G + F in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).



Priloga O: Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih majhnih podenot encima RuBisCO (CbbS), udeleženih v Calvin–Bensonovem ciklu fiksacije CO₂. Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (rdeči tisk) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + G in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).



Priloga P: Filogenetsko drevo bakterijskih metagenomskih hidroksilamin-oksido-reduktaz (Hao)/ hidrazin-oksido-reduktaz (Hzo), udeleženih v bakterijski aerobni oksidaciji amonijaka (Hao) in anaerobni oksidaciji amonijaka (Hzo). Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (na sliki označena z rdečo barvo) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin WAG + G in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).



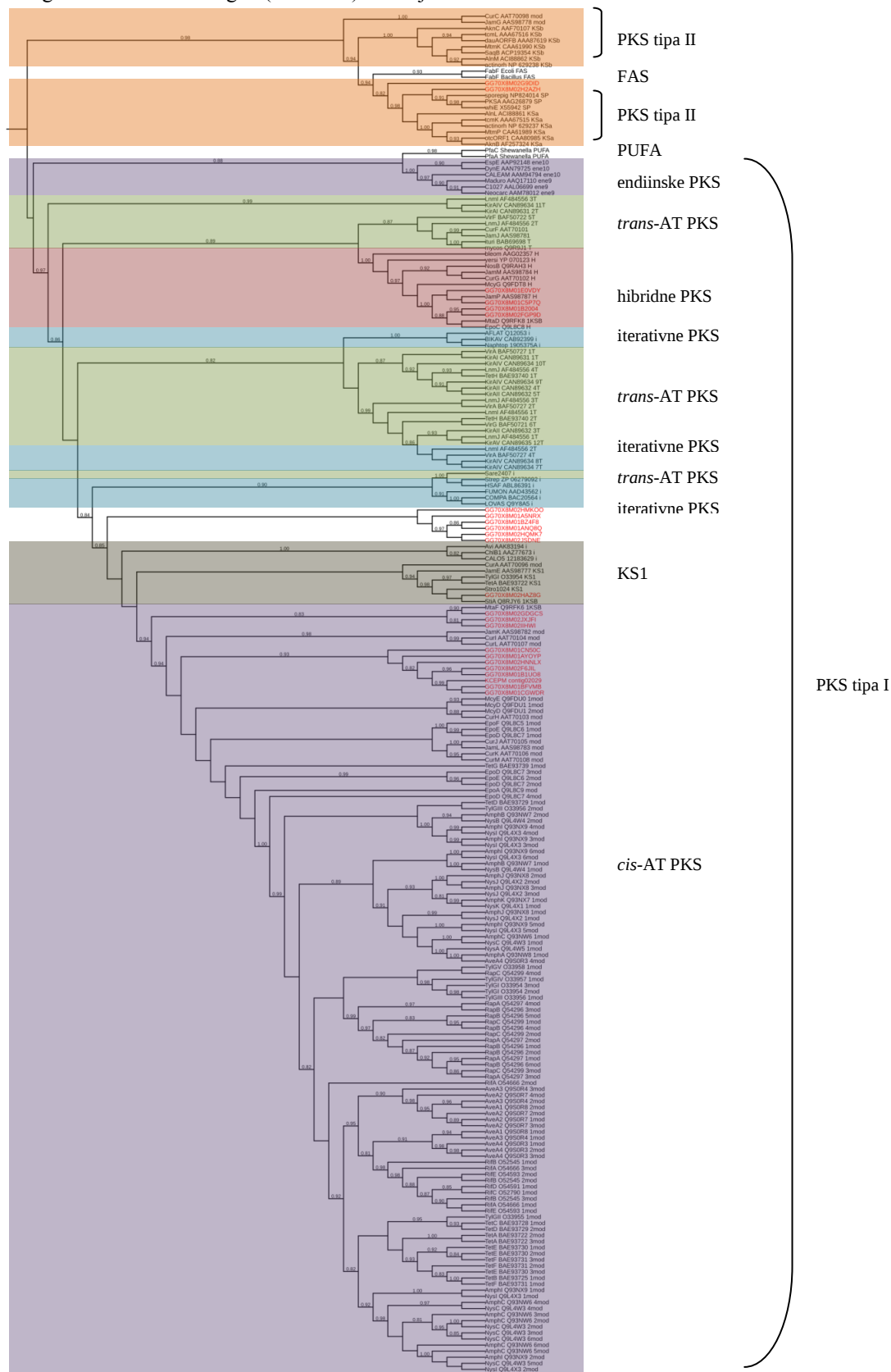
Priloga H: Filogenetsko drevo metagenomskih podenot A reduktaz adenzin-5'-fosfosulfata (AprA), udeleženih v anaerobni sulfatni respiraciji in aerobni litotrofni oksidaciji sulfita po APS-poti. Ker so encimi, udeleženi pri obeh procesih, homologni, smo litotrofno oksidacijo sulfita ali redukcijo sulfata (anaerobno dihanje) privzeli iz njihovih najsorodnejših karakteriziranih encimov. Referenčno filogenetsko drevo smo izrisali s programom RAxML in kratka metagenomska zaporedja (rdeči tisk) umestili na referenčno drevo z algoritmom RAxML EPA. Z odebeljenim rdečim tiskom so predstavljena metagenomska zaporedja, udeležena v oksidaciji sulfita. Filogenetsko drevo smo izrisali z uporabo substitucijskega modela aminokislin LG + G + F in uporabo hitrega neparametričnega testa samovzorčenja (*bootstrap*).

Priloga I: Ocena velikosti gruč genov (biosinteznih poti) PKS/NRPS na primeru 10 različnih bakterijskih sekundarnih metabolitov. Prikazani sekundarni metaboliti so vključeni tudi v podatkovno zbirko NaPDoS.

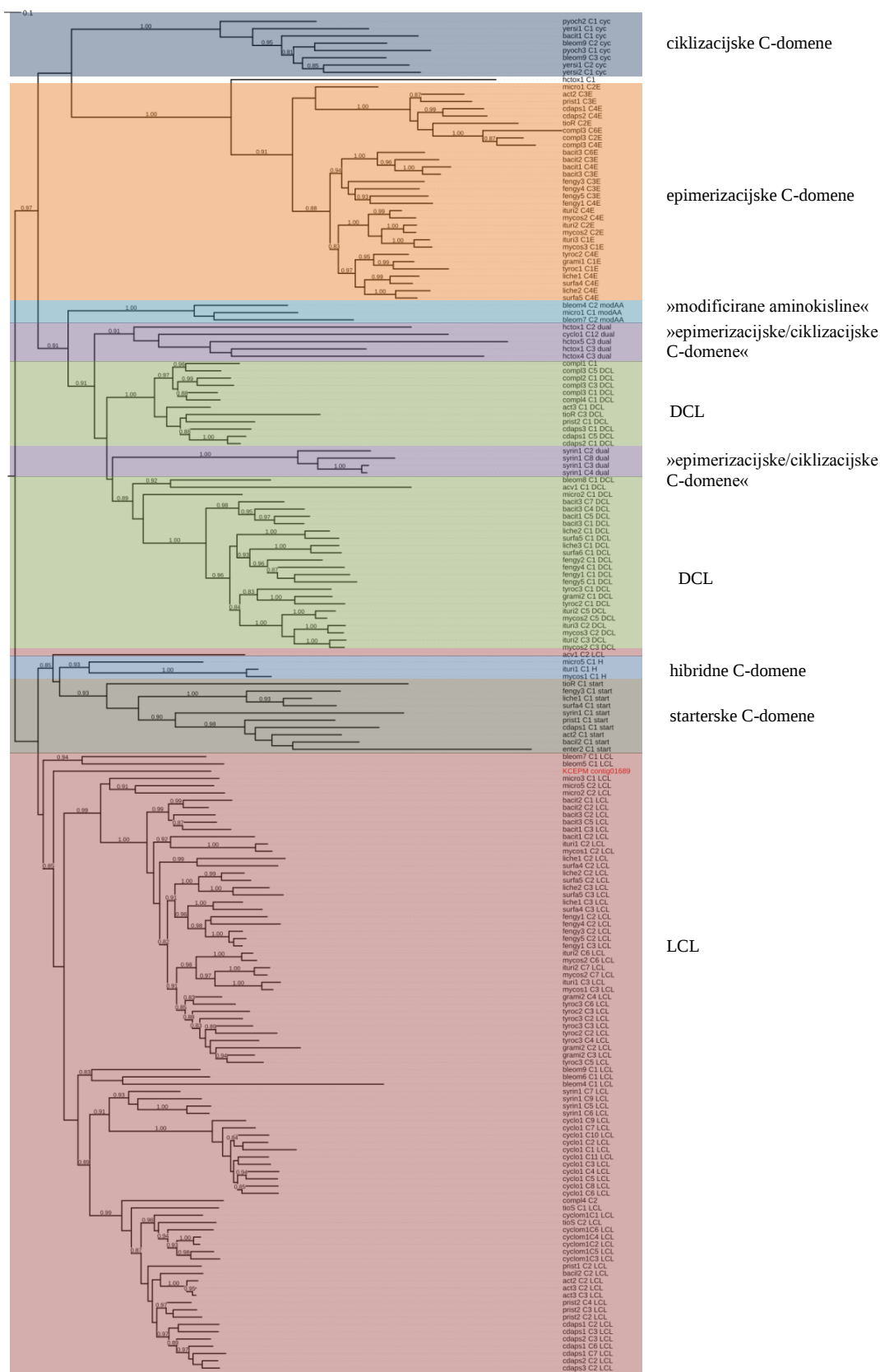
Sekundarni metabolit	Tip sintaze (PKS/NRPS)	Producent*	Opis sekundarnega metabolita	Velikost gruče genov z zapisom za PKS [kb]	Vir
aktinomicin	NRPS	<i>Streptomyces chrysomallus</i>	kromopeptidni lakton, interkalator z anti-neoplastično aktivnostjo	50	Keller in sod., 2011
aktinorodin	PKS tipa II	<i>Streptomyces coelicolor</i>	aromatski poliketid, antibiotik	22	Okamoto in sod., 2009
avermektin	PKS tipa I	<i>Streptomyces avermitilis</i>	makrociklični lakton z antihelmintično aktivnostjo	90	Ikeda in sod., 1999
avilamicin	PKS tipa I	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	oligosaharidni antibiotik, rastni spodbujevalec	65	Gaisser in sod., 1997
bacilibaktin	NRPS	<i>Bacillus elgii</i>	siderofor	12,8	Wen in sod., 2011
eritromicin	PKS tipa I	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	makrolidni antibiotik širokega spektra	56	Reeves in sod., 1999
kuracin A	PKS tipa I	<i>Lyngbya majuscula</i>	antimitotični agens, ki inhibira polimerizacijo mikrotubulov	64	Chang in sod., 2004
pioluteorin	PKS tipa I	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	majhen kloriran pirol s protiglivno aktivnostjo	24	Nowak-Thompson in sod., 1999
salinisporamid	PKS–NRPS	<i>Salinispora tropica</i>	inhibitor proteasoma s protirakavo aktivnostjo	41	Eustáquio in sod., 2009
stigmatelin	PKS tipa I	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	aromatski inhibitor elektronske prenašalne verige	65	Gaitatzis in sod., 2002

*našteti producenti niso nujno edina vrsta, ki proizvaja omenjen sekundarni metabolit

Priloga J: Funkcijska klasifikacija in filogenetska uvrstitev domnevnih ketosintaznih (KS) domen iz metagenoma »Echo Passage« (rdeči tisk) z orodjem NaPDoS



Priloga K: Funkcijska klasifikacija in filogenetska uvrstitev domnevne kondenzacijske (C) domene (rdeči tisk) iz metagenoma »Echo Passage« z orodjem NaPDoS



Priloga L: Klasifikacija ketosintaznih (KS) domen v PKS z orodjem NaPDoS (Ziemert in sod., 2012)

Tip PKS	Razred PKS	Opis	Produkt (primer produkta)
PKS tipa I	endiin	deluje iterativno, običajno tvori tvori 9- ali 10-členske endiine	endiin (kaliheamicin)
	<i>trans</i> -AT	modul ne vsebuje lastne AT-domene, temveč je ta kodirana v <i>trans</i>	poliketid/makrolid (leinamicin)
	<i>cis</i> -AT	večdomenski modul, ki vsebuje lastno AT-domeno	poliketid/makrolid (eritromicin)
	hibridna	katalizira kondenzacijo med aminokislino in acilno podaljševalno enoto v NRPS/PKS	peptid–poliketid (mikrocistin)
	iterativna	domena se pri sintezi uporabi večkrat na ciklični (iterativni) način	policiklični poliketid (aflatoksin)
	PUFA*	tvori dolgoverižne maščobne kisline z več kot eno dvojno vezjo	večkrat nenasičena maščobna kislina (omega-3–maščobna kislina)
	KS1	vključuje začetne (starterske) KS-domene, ki so prisotne v prvem modulu večdomenske gručice genov, in KS-domene, ki katalizirajo vključitev nenavadnih prekurzorjev v rastoči polimer	poliketid, peptid–poliketid (salinosporamid)
PKS tipa II	PKS tipa II	vsaka domena se nahaja na ločeni beljakovini	aromatski poliketid (aktinorodin)
	FAS*	sodeluje v sintezi maščobnih kislin	maščobna kislina (palmitinska kislina)

*gre za gručice genov, katerih produkti so udeleženi v primarnem metabolizmu (sintezi maščobnih kislin). FAS, sintaza maščobnih kislin; PUFA, večkrat nenasičena maščobna kislina; AT, aciltransferazna domena.

Priloga Z: Klasifikacija kondenzacijskih (C) domen v NRPS z orodjem NaPDoS (Ziemert in sod., 2012)

Razred C-domene	Opis
LCL	katalizira kondenzacijo L-aminokislina z rastočim peptidom, ki ima na koncu L-aminokislino
DCL	katalizira kondenzacijo L-aminokislina z rastočim peptidom, ki ima na koncu D-aminokislino
starterska	acilirajo prvo aminokislino z β -hidroksikarboksilno kislino
ciklizacijska	katalizirajo nastanek peptidne vezi in nadaljnjo ciklizacijo cisteinskega, serinskega ali treoninskega ostanka
epimerizacijska	spremenijo kiralnost zadnje aminokislina v rastočem peptidu
epimerizacijska–kondenzacijska	katalizirajo epimerizacijske in kondenzacijske reakcije
»modificirane aminokislina«*	verjetno katalizirajo modifikacijo vključenih aminokislin (npr. dehidracija serina v dehidroalanin)
»hibridne«*	verjetno katalizirajo kondenzacijo aminokislina z aminiranim poliketidom, kar vodi v nastanek hibridnega sekundarnega produkta

*razred funkcijsko še ni bil opredeljen