

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mojca SEKIRNIK

**ANALIZA MIKROBIOTE CVETNEGA PRAHU
SKLADIŠČENEGA V SATNIH CELICAH V PANJIH
KRANJSKE ČEBELE (*Apis mellifera carnica Pollman*)**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Mojca SEKIRNIK

**ANALIZA MIKROBIOTE CVETNEGA PRAHU SKLADIŠČENEGA V
SATNIH CELICAH V PANJIH KRANJSKE ČEBELE (*Apis mellifera
carnica* Pollman)**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**ANALYSIS OF BEE BREAD POLLEN MICROBIOTA STORED IN
HIVES OF CARNIOLAN BEE (*Apis mellifera carnica* Pollman)**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes - Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v laboratoriju na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gorazda Avguština, za somentorja izr. prof. dr. Janka Božiča in za recenzentko doc. dr. Nežo Čadež.

Mentor: prof. dr. Gorazd Avguštin

Somentor: izr. prof. dr. Janko Božič

Recenzentka: doc. dr. Neža Čadež

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: izr. prof. dr. Janko BOŽIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Neža ČADEŽ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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

Mojca Sekirnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 638.178.2:579.25/.26:577.2.088(043)=163.6
KG	cvetni prah / čebelji kruhek / mikrobiota cvetnega prahu / molekularne tehnike / izolacija DNA / PCR / 16S rRNA / DGGE / <i>Lactobacillus kunkeei</i>
AV	SEKIRNIK, Mojca, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	AVGUŠTIN, Gorazd (mentor) / BOŽIČ, Janko (somentor) / ČADEŽ, Neža (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2015
IN	ANALIZA MIKROBIOTE CVETNEGA PRAHU SKLADIŠČENEGA V SATNIH CELICAH V PANJIH KRANJSKE ČEBELE (<i>Apis mellifera carnica</i> Pollman)
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XIII, 67 str., 10 pregl., 25 sl., 13 pril., 72 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Cvetni prah, ki ga čebele skladiščijo v satnih celicah panja, se imenuje čebelji kruhek in zanje predstavlja edini vir beljakovin. Po določenem času naj bi se tako uskladiščen cvetni prah biokemijsko spremenil in konzerviral, vendar mehanizmi tega procesa niso popolnoma znani. Zaradi prisotnosti mlečne kislina v čebeljem kruhku bi lahko v proces zorenja bile vključene tudi bakterije, zato smo želeli dobiti vpogled v bakterijsko mikrobioto čebeljega kruhka. V nalogi smo ugotavljali ali in kako se ta mikrobiota spreminja. Vzorce smo filtrirali, da smo odstranili rastlinski material, izolirali skupno mikrobno DNA in z evolucijsko ohranjenimi bakterijskimi začetnimi oligonukleotidi pomnožili taksonomsko informativne odseke ribosomskih genov (16S rDNA) z verižno reakcijo s polimerazo. Pomnožke smo ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v gradientu denaturanta. Sklepamo, da je bilo v izbranih vzorcih malo bakterijskega materiala, zaradi česar kljub različnim postopkom izolacije DNA nismo pridobili dovolj kakovostne DNA, dodatne težave pri analizah pa je povzročal tudi prisoten rastlinski material. Sklepamo lahko, da se struktura mikrobiote razlikuje med satnimi celicami, ne pa tudi znotraj posamezne satne celice. Iz vzorcev čebeljega kruhka smo izolirali DNA po Gramu pozitivne vrste <i>Lactobacillus kunkeei</i> , ki v tem ekosistemu verjetno prevladuje. Z gojitvenimi tehnikami pa smo izolirali bakterije iz rodu <i>Bacillus</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 638.178.2:579.25/.26:577.2.088(043)=163.6
CX	pollen / bee bread / microbiota / molecular techniques / DNA isolation / PCR / 16S rRNA / DGGE / <i>Lactobacillus kunkeei</i>
AU	SEKIRNIK, Mojca
AA	AVGUŠTIN, Gorazd (supervisor) / BOŽIČ, Janko (co-advisor) / ČADEŽ, Neža (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY	2015
TI	ANALYSIS OF BEE BREAD POLLEN MICROBIOTA STORED IN HIVES OF CARNIOLAN BEE (<i>Apis mellifera carnica</i> Pollman)
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes – Field Microbiology)
NO	XIII, 67 p., 10 tab., 25 fig., 13 ann., 72 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Bee bread is pollen stored in honeybee comb cells of the hive. It represents the only source of protein for bees. After some time pollen is biochemically changed into bee bread, however, the exact mechanisms are poorly understood. We tried to get an insight into bee bread bacterial microbiota in order to find out whether and how it changes in individual comb cells. The samples were filtrated to remove the plant material of pollen grains, and then total microbial DNA was isolated. Fragments of taxonomically informative genes of 16S rRNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using evolutionarily conserved bacterial primers. PCR products were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). We conclude that analysed samples contained only small amounts of biological material which was insufficient for isolation of high quality DNA despite the fact that several different isolation methods were applied. Additional problems were encountered due to the present plant material. On the basis of the acquired results we can conclude, however, that there are differences in microbiota structure when different comb cells are compared, but not when vertical profiles of the same comb cells are analysed. In bee bread samples the DNA of Gram positive bacterial species <i>Lactobacillus kunkeei</i> was detected by molecular methods, which appears to be the dominant microorganism in the bee bread ecosystem. <i>Bacillus</i> species were detected using cultivation methods.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK.....	XIII

1 UVOD	1
1.1 NAMEN MAGISTRSKE NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KRANJSKA ČEBELA.....	3
2.2 ŽIVLJENJE ČEBEL.....	3
2.3 OD CVETNEGA PRAHU DO ČEBELJEGA KRUHKA.....	5
2.4 BIOKEMIJSKA SESTAVA IN HRANILNA VREDNOST CVETNEGA PRAHU	6
2.5 PRENOS MIKROORGANIZMOV	9
2.6 MIKROBIOTA CVETNEGA PRAHU.....	10
2.7 MIKROBIOTA ČEBELJEGA PREBAVNega TRAKTA	10
2.8 MIKROBIOTA ČEBELJEGA KRUHKA	12
2.9 PRISTOPI K PREUČEVANJU ČEBELJE MIKROBIOTE	15
2.10 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA Z GRADIENTOM DENATURANTA (DGGE)	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 POTEK DELA.....	18
3.2 MATERIALI.....	19
3.2.1 Vzorci.....	19
3.2.2 Reagenti.....	20
3.2.3 Pufri in raztopine.....	21
3.2.4 Mikrobiološka gojišča in bakterijske kulture.....	21

3.2.5	Laboratorijska oprema	22
3.2.6	Računalniški programi	22
3.3	METODE	23
3.3.1	Gojenje in analiza bakterij iz čebeljega kruhka.....	23
3.3.2	Priprava bakterijskih kultur <i>E. coli</i> K12, <i>P. bryantii</i> B14 in <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> 1612A.....	23
3.3.3	Priprava vzorcev za izolacijo skupne bakterijske DNA	23
3.3.4	Izolacija bakterijske DNA	24
3.3.5	Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....	26
3.3.6	Agarozna gelska elektroforeza	27
3.3.7	Poliakrilamidna gelska elektroforeza z gradientom denaturanta (DGGE)...	28
3.3.8	Postopki pridobivanja DNA za sekvenciranje.....	28
3.3.9	Analiza sekvenc.....	28
4	REZULTATI	30
4.1	OPTIMIZACIJA METOD	30
4.1.1	Začetni poskusi	30
4.1.2	Uporaba različnih metod izolacije DNA	31
4.1.3	Vgnezdna verižna reakcija s polimerazo.....	33
4.1.4	Analiza prisotnosti rastlinske DNA v preučevanih vzorcih	34
4.1.5	Preprečevanje pomnoževanja rastlinske DNA	39
4.1.6	Gradientna verižna reakcija s polimerazo.....	41
4.1.7	Odstranjevanje rastlinskih delcev s filtracijo	42
4.2	ANALIZA SESTAVE MIKROBIOTE ČEBELJEGA KRUHKA	44
4.2.1	Analiza sekvenc izbranih lis na gelu DGGE	46
4.2.2	Gojenje in analiza bakterij iz čebeljega kruhka.....	50
5	RAZPRAVA.....	52
6	SKLEPI	59
7	POVZETEK.....	60
8	VIRI	62
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava med hraničnimi vrednostmi svežega peloda, obnožine in čebeljega kruhka (Human in Nicolson, 2006: 1488).....	8
Preglednica 2: Pregled uporabljenih reagentov za izolacijo DNA, PCR, gelsko elektroforezo in DGGE.....	20
Preglednica 3: Pregled in sestava uporabljenih pufrov in raztopin	21
Preglednica 4: Pregled uporabljenih bakterijskih kultur in mikrobioloških gojišč	21
Preglednica 5: Pregled laboratorijske opreme	22
Preglednica 6: Pregled uporabljenih računalniških programov.....	22
Preglednica 7: Končna koncentracija reagentov za posamezno reakcijo PCR v reakcijski mešanici pri uporabi različnih parov začetnih oligonukleotidov.....	26
Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje genskih odsekov 16S rDNA	27
Preglednica 9: Protokoli reakcij PCR s pari začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R, FD1 in NadkarniR ter HDA1-GC in HDA2.....	27
Preglednica 10: Razvrstitev rezultatov z orodji Classifier in SeqMatch s spletno strani RDP ter s programom megablast s spletno strani NCBI	48

KAZALO SLIK

Slika 1: Kranjske čebele na bradi panja (Foto: Sekirnik M.)	3
Slika 2: Od cvetnega prahu poprašena čebela med nabiranjem (Foto: Sekirnik M.)	4
Slika 3: Delavka pri zbiranju cvetnega prahu (Foto: Sekirnik M.)	5
Slika 4: Čebelji kruhek v satju (Foto: Sekirnik M.)	6
Slika 5: Shema dela	18
Slika 6: Shematski prikaz vzorčenja čebeljega kruhka (prirejeno po Podrižnik in Božič, 2014)	19
Slika 7: Gelska elektroforeza DGGE pomnoženih genskih odsekov za mikrobnno 16S rRNA iz testnih vzorcev za začetno analizo	31
Slika 8: Gelska elektroforeza DGGE testnih vzorcev (1, 2, 3 in 4sp), iz katerih smo izolirali DNA po metodah A, B, C, D in E	32
Slika 9: Gelska elektroforeza DGGE testnih vzorcev (1, 2, 3 in 4sp), iz katerih smo izolirali DNA po metodah A, D, F, G in H	32
Slika 10: Gelska elektroforeza DGGE testnih vzorcev (5sr, 6sp in 7sr) z vgnezdeno PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA v primerjavi z enostopenjsko PCR	33
Slika 11: Gelska elektroforeza DGGE v enostopenjski PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA testnih vzorcev (8, 9, 10 in 11).....	34
Slika 12: Rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvene z orodjem RDP Classifier.	35
Slika 13: Rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvene iz gela DGGE z orodjem RDP Classifier.	36
Slika 14: Rezultati poizvedbe SeqMatch z daljšo sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R (zgoraj) ter krajevno sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2 (spodaj).	37
Slika 15: Rezultati poizvedbe z orodjem megablast z daljšo sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R (zgoraj) ter krajevno sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2 (spodaj).....	38
Slika 16: Gelska elektroforeza DGGE z vgnezdeno reakcijo PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA.....	40

Slika 17: Gelski elektroforezi gelov DGGE z gradientno reakcijo PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA	41
Slika 18: Z epifluorescentnim mikroskopom posneta slika cvetnega prahu pred (levo) in po filtraciji (desno).....	42
Slika 19: Gelska elektroforeza DGGE dveh filtriranih vzorcev (1 in 2) po različnih metodah izolacije DNA (A, B, C, D, E)	43
Slika 20: Slika agarognega gela po elektroforezi pomnoženih produktov reakcije PCR vzorcev za končno analizo mikrobiote čebeljega kruhka	44
Slika 21: Gelska elektroforeza DGGE vzorcev za končno analizo mikrobiote čebeljega kruhka..	45
Slika 22: Slika poliakrilamidnega gela DGGE, iz katerega smo izrezali izbrane lise za pridobivanje sekvenc.	47
Slika 23: Prikaz tipične bakterijske rasti iz čebeljega kruhka	50
Slika 24: Rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljenih sekvenc iz čistih kultur z orodjem RDP Classifier.....	50
Slika 25: Gelska elektroforeza DGGE analiziranih vzorcev mikrobiote čebeljega kruhka v primeravi z gojenimi sevi iz čebeljega kruhka	51

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Prikaz testnih vzorcev z oznakami na slikah, ki smo jih uporabili na začetku analize (slika 7)
- Priloga B: Prikaz testnih vzorcev z oznakami na slikah, ki smo jih uporabili za optimizacijo metod (slike 8, 9, 10, 11, 16, 17, 19 in 22)
- Priloga C: Prikaz vzorcev za končno analizo pri nalogi (sliki 21 in 25)
- Priloga D: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X1 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga E: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X2 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga F: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X3 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga G: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X4 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga H: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X5 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga I: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X6 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga J: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X7 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga K: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture Y1 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga L: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture Y2 z orodjem RDP SeqMatch
- Priloga M: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture Y3 z orodjem RDP SeqMatch

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat (ang. Ammonium PerSulfate)
BHI	gojišče za bakterije (ang. Brain Heart Infusion)
BLAST	orodje na spletni strani NCBI, ki omogoča iskanje podobnih sekvenc v bazah podatkov (ang. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
CTAB	heksadecilmethylamonijev bromid (ang. Cetyl TrimethylAmmonium Bromide)
DGGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v gradientu denaturanta (ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. DeoxyriboNucleic Acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat (ang. DeoxyNucleotide TriPhosphates)
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (ang. EthyleneDiamineTetraacetic Acid)
EtBr	etidijev bromid (ang. EThidium BRomide)
EtOH	etanol
kb	kilobaza
MRS	gojišče za mlečnokislinske bakterije (ang. De Man, Rogosa, Sharpe)
NA	hranilni agar (ang. Nutrient Agar)
NCBI	spletni servis in baza sekvenc (ang. National Center for Biotechnology Information),
NaCl	natrijev klorid
PBS	fosfatni pufer (ang. Phosphate Buffered Saline)
PBX	fosfatni pufer, ki vsebuje 10x manjšo vsebnost NaCl kot PBS
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PYG	gojišče za gojenje anaerobnih bakterij
RBB+C	metoda izolacije DNA, ki sta jo opisala Yu in Morrison (2004) (ang. Repeated Bead Beating plus Column method)
rDNA	ribosomska DNA (ang. Ribosomal DNA)
RDP	spletni servis in baza sekvenc 16S rRNA (Ribosomal Database Project)

RNA	ribonukleinska kislina (ang. RiboNucleic Acid)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (ang. Ribosomal RiboNucleic Acid)
16S rRNA	molekula rRNA, ki se nahaja v manjši podenoti ribosoma
SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. Sodium Dodecyl Sulfate)
ssDNA	enoverižna molekula DNA (ang. Single-Stranded DNA)
TAE	Tris-ocetna kislina-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (ang. TEtraMethylEthyleneDiamine)
Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan (ang. TRIS(hydroxymethyl)aminomethane)
U	enota (ang. Unit)
v/v	volumen glede na volumen (ang. volume per volume)
w/v	teža glede na volumen (ang. weight per volume)

SLOVARČEK

artefakt	rezultat, ki je posledica metodoloških postopkov
cvetni prah (pelod)	moške spolne celice v prašnikih cvetov semenk (ang. pollen)
čebelji kruhek	v satnih celicah shranjen cvetni prah, ki se po določenem času biokemijsko spremeni in služi kot glavni vir beljakovin pri prehrani ličink in odraslih panjskih čebel (ang. bee bread)
košek (korvikula)	vdolbinica na goleih zadnjega para nog pri čebeli delavki, ki ima na robovih daljše dlačice, namenjene zbiranju in prenosu cvetnega prahu (ang. curviculum, pollen basket)
medni želodček	del prebavnega trakta čebele delavke, v katerem shranjuje medičino, mano in vodo, dokler vsebine ne izbljuva na določeno mesto v panju (ang. honey bag, honey sac, honey stomach)
nektar (medičina)	sladek sok, ki se izloča v cvetnih in izvencvetnih medovnikih medovitih rastlin (ang. nectar)
obnožina	grudice, ki jih čebele s prašnikov cvetov semenk v koških zadnjih nog prinašajo v panj, jih delno predelajo in shranjujejo v satne celice za hrano ličink in odraslih osebkov (ang. pollen pellets, polen load)
satna celica	osnovni del čebeljega sata v obliki pravilne pokončne šesterostrande prizme, ki ga čebele delavke izdelajo iz voska, izločenega iz voskovnih žlez in jih uporabljajo za razvoj čebelje zalege, hrambo medu in cvetnega prahu; čebelja celica (ang. honeybee comb cell)
stiskalni sklep (preša)	del tretjega para čebeljih nog za stiskanje cvetnega prahu v grudice (ang. pollen press)
trofilaksa	izmenjava hrane med čebelami (ang. trophallaxis)

1 UVOD

Glavno poslanstvo čebel je oprševanje cvetočih rastlin (Javornik in sod., 1984). Med tem nabirajo pelod, ki ga vlažijo z izločki svojih žlez ter ga prinesejo v panj in uskladiščijo v satne celice (Casteel, 1912). Po določenem času se pelod biokemijsko spremeni in postane t. i. 'čebelji kruhek' (ang. bee bread), ki čebelji družini predstavlja edini vir beljakovin, poleg teh pa je tudi vir maščobnih kislin, lipidov, sterolov, vitaminov, mineralov in ogljikovih hidratov (Loper in sod., 1980). Čebelji kruhek naj bi bil posledica mlečnokislinske fermentacije (Haydak, 1970), v proces zorenja pa bi lahko bilo vključenih več mikroorganizmov (Gilliam, 1997; Anderson in sod., 2013).

Shade in sodelavci (2013) so z molekularno-biološkimi metodami opisali vrstno pestrost mikrobiote cvetov jablane. Ko čebele mešajo pelod z izločki svojih žlez, da bi ga navlažile in tako lažje spravile v koške zadnjih nog za varen prenos v panj, ga dodatno inokulirajo z mikrobioto mednega želodčka (Vasquez in Olofsson, 2009). Razmere v panju, kjer je stalna temperatura okoli 34 °C (Dunham, 1931) in vlaga 24 %, so primerne za razrast mikroorganizmov (Haydak, 1970). Čebele so socialna bitja in si med seboj izmenjujejo hrano (Nixon in Ribbands, 1952), zato je prenos mikroorganizmov še toliko verjetnejši (Anderson in sod., 2013).

Mikrobno združbo čebeljega kruhka raziskovalci intenzivneje preučujejo šele v zadnjem času. Prva se je raziskav z gojitvenimi tehnikami lotila dr. Martha Gilliam (Gilliam 1979a; Gilliam, 1979b; Gilliam in sod., 1989) in odkrila raznolike mikroorganizme, od bakterij do plesni in kvasovk. Z gojitvenim pristopom so v švedski študijski skupini (Vasquez in Olofsson, 2009) preiskovali vpletene mlečnokislinske bakterij pri pridelavi hranilno bogatega čebeljega kruhka. Anderson in sodelavci (2013) so želeli opisati mikrobioto čebeljega kruhka s primerjalnim pristopom molekularnih in gojitvenih tehnik. Mattila in sodelavci (2012) so zaradi pomanjkljivosti molekularnih tehnik na osnovi DNA analizirali molekule RNA, saj jih proizvajajo aktivne bakterije in tako dajejo informacije o aktivni mikrobioti. Anderson in sodelavci so v letu 2014 izvedli raziskavo, kjer ugotavljajo, da v čebeljem kruhku sploh ni prisotnih dovolj bakterij za izvedbo fermentacije, ki bi bistveno pripomogla pri biokemijski pretvorbi čebeljega kruhka.

V tej nalogi smo želeli z molekularnimi metodami (PCR, DGGE, sekvenciranje) ugotoviti, kakšna je sestava mikrobiote, ki naseljuje čebelji kruhek. S tem smo želeli preveriti ali obstajajo razlike v strukturi mikrobiote v posameznih satnih celicah ter ali lahko opazimo razlike v strukturi mikrobiote med različnimi celicami satja. V vzorcih smo te spremembe pričakovali zaradi različne vsebnosti mlečne kisline v satnih celicah.

1.1 NAMEN MAGISTRSKE NALOGE

Z magistrsko nalogo smo želeli z molekularnimi tehnikami ugotoviti, ali so v čebeljem kruhu mikroorganizmi sploh prisotni ter ali je mikrobiota pestra. Zanimalo nas je tudi:

- ali obstajajo razlike v sestavi mikrobiote znotraj posameznih satnih celic,
- ali obstajajo razlike tudi med posameznimi satnimi celicami ter
- ali se mikrobiota medu, s katerim čebele prekrijejo skladiščen cvetni prah, razlikuje od mikrobiote čebeljega kruhka.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Iz vzorcev čebeljega kruhka bomo uspešno izolirali celokupno mikrobno DNA in z metodo PCR pomnožili informacijske odseke za nadaljnje molekularne raziskave,
- z molekularno-tipizacijskimi tehnikami (DGGE) bomo spremljali pestrost in razlike prisotne mikrobiote v posameznih satnih celicah in med njimi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRANJSKA ČEBELA

Kranjska čebela, siva čebela ali sivka (nem. Krainer Biene; ang. Carniolan bee), strokovno imenovana *Apis mellifera carnica* Pollman 1879, je v svetu priznana in cenjena rasa (podvrsta) medonosnih čebel ter je danes druga najbolj razširjena rasa čebel na svetu. Njeno avtohtono območje sega od zahodnega Balkana do srednje Evrope, kot podvrsta pa se je pod vplivom alpskega sveta na slovenskem ozemlju oblikovala po zadnji ledeni dobi pred približno deset tisoč leti (ReZKČ, 2014). Čebelja družina kranjske čebele se spomladi burno razvija, zato je tudi nagnjena k rojenju. Poleti je zelo živahna in lahko popolnoma izkoristi obilne paše. Kranjska čebela je znana tudi po tem, da ima izrazito dolg rilček, izletava bolj zgodaj in z oddaljenih paš nosi več medu. Ima izreden smisel za orientacijo in je nadpovprečna graditeljica satja. Jeseni zmanjša obseg čebelje družine, zato dobro prezimuje in porabi malo zimskih zalog. Med čebelarji je zelo priljubljena, saj jo že od nekdaj poznajo kot najbolj krotko od vseh čebeljih ras. Poleg mirnosti se odlikuje še po delavnosti, dolgoživosti, izjemnem izkoriščanju paše, dobrem prezimovanju in manjši tvorbi propolisa, kar za čebelarja pomeni lažje in hitrejše delo v čebelnjakih (Javornik in sod., 1984; Stark, 1998).



Slika 1: Kranjske čebele na bradi panja (Foto: Sekirnik M.)

2.2 ŽIVLJENJE ČEBEL

Življenje čebel se začne, ko matica v posamezno satno celico izleže po eno jajče. Po treh dneh nastopi doba odkritih ličink ali žerk, saj se začno prehranjevati z matičnim mlečkom, čez nekaj dni pa tudi z medom in s cvetnim prahom. V tem času se večkrat levijo. Dvanajsti dan nastopi doba pokritih ličink ali bub. V tem času se zavijejo v kokon, panjske čebele pa jih pokrijejo z voščenimi pokrovci. Enaindvajseti dan od zalege jajčec se izležejo odrasle čebele. Najprej jih čaka naloga hišnih oz. panjskih čebel, kjer sprva čistijo celice, potem nekaj dni krmijo starejše ličinke z medom in s cvetnim prahom, nato postanejo spremeljevalke matice. Matico in najmlajše ličinke krmijo z matičnim mlečkom. Kmalu po tej dobi se jim razvijejo voskovne žleze, zato gradijo novo satje, opravljajo pa tudi druge naloge v panju in sicer sprejemajo medičino, napolnjujejo celice s cvetnim prahom ter prezračujejo panj. Gredo tudi na prve orientacijske polete, potem pa prevzamejo vlogo stražark. Po treh tednih hišnih čebel postanejo pašne čebele, njihova naloga je nabiranje medičine, cvetnega prahu in vode. To delo opravljajo povprečno 25 dni (Javornik in sod., 1984; Božič, 1998).

Narava je poskrbela za sožitje čebel in cvetočih rastlin tako, da čebele z oprševanjem pripomorejo k razširjanju rastlinskih vrst, z njihovo medicino in s cvetnim prahom pa dobijo dovolj hranil za obstoj in razvoj čebelje družine (Javornik in sod., 1984).



Slika 2: Od cvetnega prahu poprašena čeba med nabiranjem (Foto: Sekirnik M.)

Cvetni prah ali pelod so moške oplojevalne celice cvetočih rastlin. Da bi prišlo do oploditve, se morajo ta zrnca prenesti na brazde pestičev drugih cvetov iste vrste rastline. Glavno nalogu pri tem opravijo čebele. Njihovo telo je poraslo z majhnimi dlačicami, na katere se ujamejo lepljiva zrnca cvetnega prahu, ko čeba sede na cvet. Med letom se čeba čisti in ves cvetni prah s telesa spravi do zadnjih nog, kjer ima na robovih daljše dlačice, ki tvorijo košek ter so namenjene zbiranju in prenosu cvetnega prahu (Javornik in sod., 1984; Kozmus in sod., 2011). V košku zlepljen cvetni prah na golenih zadnjega para nog se imenuje obnožina (ang. pollen load, pollen pellets) (Bokal, 2009). Ko se čebele vračajo v panj, v povprečju prinašajo 10 do 15 miligramov cvetnega prahu (Javornik in sod., 1984; Kozmus in sod., 2011).

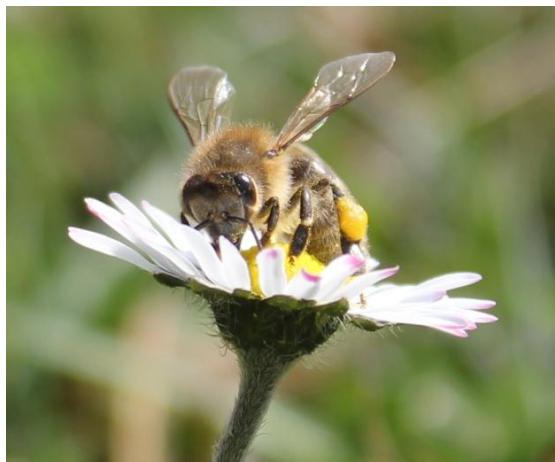
V panju poiščejo primerno satno celico, navadno v bližini zalege, kamor s svojih nog zdrgnejo kepe cvetnega prahu (Božič, 1998). Približno osemnajstkrat se morajo natovoriti, da napolnijo celico (Javornik in sod., 1984). Potem panjske čebele nabrani cvetni prah vlažijo z izločki nekaterih svojih žlez (Božič, 1998; Human in Nicolson, 2006; Kozmus in sod., 2011) in ga tlačijo na dno celice, da ga čim več spravijo vanje. Nato stlačeni cvetni prah do roba zalijejo z medom in pokrijejo z voščenim pokrovcem (Božič, 1998; Kozmus in sod., 2011).

Čebele se prehranjujejo le s tako predelanim cvetnim prahom, ki se ga je prijelo ime 'čebelji kruhek' (ang. bee bread), saj je zanje življensko pomemben (Herbert in Shimanuki, 1978; Javornik in sod., 1984; Winston, 1991; Meglič, 1998; Kozmus in sod., 2011). Je bogat vir hranil, še posebej beljakovin, vsebuje pa tudi vodo, ogljikove hidrate, proste aminokisline, maščobe, vitamine in minerale (Loper in sod., 1980; Standifer in sod., 1980; Javornik in sod., 1984; Rihar, 1998; Campos in sod., 2008; Kozmus in sod., 2011; Feas in sod., 2012). V njem najdejo vsa potrebna hranila za razvoj in razmnoževanje. Za čebele

predstavlja edini vir beljakovin, te pa so nujno potrebne za razvoj ličink, za delovanje voskovnih žlez in za sintezo matičnega mlečka. Če ga nimajo dovolj, se slabo razvijajo, matica preneha zaledati, panjske čebele pa prenehajo izdelovati vosek in graditi satje. Čebelja družina naj bi na leto porabila okoli 40 kg cvetnega prahu (Javornik in sod., 1984).

2.3 OD CVETNEGA PRAHU DO ČEBELJEGA KRUHKA

Že davno so raziskovalci na podlagi opazovanj, posnetkov in analiz preučili fiziologijo čebel pri zbiranju cvetnega prahu. Zbiranje se začne, ko čebela sede na cvet ter s svojim pristankom in premikanjem po cvetu stresa prašnike, s katerih se nanje vsuje množica zrnec cvetnega prahu in se prijemlje na dlačice čebeljega telesa. Tako sproščeni cvetni prah je precej suh in zrnat, vendar si čebela pri nabiranju pomaga tudi z ustnim aparatom. Mandibule (sprednje čeljusti) uporabi za grizenje prašnikov, pri tem pa večkrat iztegne jezik, s katerim zbira in vlaži nabran cvetni prah. Vsako zrno, ki pride v stik z deli čebeljega ustnega aparata, se temeljito navlaži in se prične zlepiljati skupaj. Tako ga lahko natlači v košek in poskrbi za varen prenos v panj. Čebele ga najraje nabirajo zjutraj, ko je na cvetu še rosa, saj je takrat cvetni prah bolj vlažen in raje tvori aggregate (Casteel, 1912).



Slika 3: Delavka pri zbiranju cvetnega prahu. S slike je razvidno nošenje zlepiljenega cvetnega prahu v košku zadnjih nog. (Foto: Sekirnik M.)

Ko je čebela že obletela nekaj cvetov in se dodobra opremila z zalogami cvetnega prahu, se začne čistiti. Cvetni prah začne zbirati pri glavi in ga po celiem telesu pomika proti zadnjemu paru nog. Čiščenje lahko opravi že na cvetu, temeljiteje, natančneje in hitreje pa v letu, saj so tako vse noge proste in učinkoviteje skrtačijo celo telo. Prvi par nog zbere po glavi razpršen cvetni prah in navlažena zrna iz ustnih žlez ter ga preda drugemu paru, ki odstrani cvetni prah s prsnega koša in trebušne regije, sprejme pa tudi cvetni prah prvega para nog in ga preda zadnjemu paru, ki skrtači še zadek. Skoraj ves cvetni prah se zbere na glavnih zadnjih nog, ki jih čebele podrgnejo med seboj, da ga pomaknejo proti preši oz. stiskalnemu sklepu (ang. pollen press), s katerim stlačijo cvetni prah v košek (ang. pollen baskets, corbicules) in tako ustvarijo kompaktno maso pelodnih zrnec. Ko čebela dokončno napolni svoja koška, se odpravi v panj (Casteel, 1912).

Ko se čebela vrne v panj, išče primerno satno celico, kamor bi odložila nabrani cvetni prah. Glavo tišči iz celice v celico, dokler ne najde prave. Ta je lahko prazna, lahko pa že vsebuje nekaj odloženega cvetnega prahu. Če je satna celica delno napolnjena z določeno vrsto cvetnega prahu, čebela tam načeloma pusti isto vrsto, čeprav so pogosto polnjene tudi z drugimi vrstami cvetnega prahu. Ni pojasnjeno, zakaj čebela izbere eno celico raje kot drugo. Ko končno najde takšno, ki ustreza njenim merilom, svoje telo močno vpne vanjo, tako da zadnje noge s polnimi koški prosto visijo znotraj nje. S srednjimi nogami navzdol močno potisne pelodno maso, da pade na dno celice. Nato zadnje noge otrese, da bi odstranila preostanek cvetnega prahu, ki se še vedno drži dlačic in površine koška. Ko to opravi, navadno zapusti celico in se pogosto ne zmeni več za dve kroglici odloženega cvetnega prahu, čeprav nekatere vseeno glavo pomolijo noter, kot da bi preverile, če je cvetni prah pravilno odložen. Od tam je prepuščen panjskim čebelam. Odloženi cvetni prah lahko kot takšen ostane v celici nekaj časa brez nadaljnje obdelave, večinoma pa se ga kmalu lotijo druge panske delavke. Z mandibulami zdrobijo kroglice, jih poteptajo, dodajo izločke svojih žlez ter skrbno zapakirajo (Casteel, 1912).



Slika 4: Čebelji kruhek v satju (Foto: Sekirnik M.)

2.4 BIOKEMIJSKA SESTAVA IN HRANILNA VREDNOST CVETNEGA PRAHU

V osnovi je čebelji kruhek sestavljen iz cvetnega prahu obnožine, ki vsebuje cvetni prah, nektar in izločke čebeljih žlez slinavk (Casteel, 1912). Z izbljuvanim nektarjem in dodajanjem izločkov svojih žlez cvetni prah inokulirajo tudi z mikroorganizmi. Večina mikroorganizmov, ki so jih našli v obnožini in čebeljem kruhku, je bila povezana s črevesno mikrobioto odraslih čebel (Gilliam, 1997). Cvetni prah se začne mikrobiološko in biokemijsko spreminjati že, kakor hitro pride v stik s čebelami (Herbert in Shimanuki, 1978; Gilliam, 1979a; Gilliam, 1979b; Loper in sod., 1980; Standifer in sod., 1980; Gilliam in sod., 1989; Human in Nicolson, 2006; Vasquez in Olofsson, 2009; Anderson in sod., 2013), sicer pa proces od cvetnega prahu do čebeljega kruhka traja od nekaj dni do nekaj tednov (Vasquez in sod., 2012). Vsebnost mlečne kislinske in drugih metabolitov naj bi preprečila kvar čebeljega kruhka (Herbert in Shimanuki, 1978), zato ga čebele lahko skladiščijo tudi do nekaj mesecev (Roulston in Cane, 2000).

Predvideva se, da je atmosfera v čebeljem kruhku mikroaerofilna do anaerobna. Zaradi stratificiranega polaganja cvetnega prahu v satno celico, se lahko ustvarijo plasti s kisikom in brez, kar podpira širok nabor bakterijske združbe od aerobov do striktnih anaerobov. Med pakiranjem in zorenjem se mikrobiota spreminja skupaj s čebeljim kruhkom (Mattila in sod., 2012). Ustvari se primerno okolje tudi za razvoj aerotolerantnih mlečnokislinskih bakterij, ki so dobra preskrbljene s hranili, predvsem s sladkorji iz nektarja in medu (Vasquez in Oloffson, 2009). Temperatura v panju je konstantna, okoli 34 °C (Dunham, 1931; Javornik in sod., 1984), pH čebeljega kruhka niha med 4 in 5 (Herbert in Shimanuki, 1978; Gilliam, 1979a).

Hrnilne vrednosti se razlikujejo glede na botanični izvor in sestavo cvetnega prahu (Campos in sod., 2008). Čebele ne uživajo svežega cvetnega prahu (Herbert in Shimanuki, 1978), ampak se prehranjujejo z uskladiščenim cvetnim prahom, ki je zanje najbolj hranljivo živilo, saj je glavni vir beljakovin, maščob, vitaminov in mikroelementov (Serra-Bonvehi in Escola-Jorda, 1997; Human in Nicolson, 2006). V primerjavi s svežim cvetnim prahom ima višjo hrnilno vrednost (Herbert in Shimanuki, 1978) domnevno zaradi metabolne aktivnosti s čebelami povezanih mikroorganizmov, ki tvorijo encime, vitamine, organske kisline in so vpleteni v procesu mlečnokislinske fermentacije (Gilliam, 1997; Vasquez in Oloffson, 2009).

Kaj se dogaja s cvetnim prahom, ko zori v celicah satja, so poskušali razvozlati že mnogi raziskovalci. Preučevali so cvetni prah v treh fazah:

- cvetni prah neposredno s cveta, t. i. svež cvetni prah,
- nabran cvetni prah, vzet iz čebeljega koška, t. i. obnožina,
- v panju oz. satnih celicah hranjen cvetni prah, t. i. čebelji kruhek

(Casteel, 1912; Loper in sod., 1980; Standifer in sod., 1980; Human in Nicolson, 2006; Gilliam in sod., 1989). Rezultati teh raziskav so podani v nadaljevanju.

Med svežim, prinešenim in shranjenim cvetnim prahom obstajajo velike razlike v vsebnosti hrnil (Human in Nicolson, 2006; Campos in sod., 2008).

Cvetni prah ima nizko vsebnost vode, navadno manj kot 20 % (Roulston in Cane, 2000). Najnižjo vsebnost vode ima svež cvetni prah, medtem ko je vlaga cvetnega prahu obnožine in čebeljega kruhka višja. Tudi mikroskopska analiza je pokazala, da so zrnca cvetnega prahu obnožine in čebeljega kruhka v primerjavi z zrnici svežega cvetnega prahu večja, hidrirana in nabrekla. Povečana vsebnost vlage je posledica dodanega nektarja in čebeljih žleznih izločkov (Human in Nicolson, 2006).

Vsebnost beljakovin cvetnega prahu se močno razlikuje glede na vrsto rastlin. Prevladujoče aminokisline so prolin, lizin, levcin, glutaminska in asparaginska kislina. V svežem cvetnem prahu je največ glutaminske kisline. Sestavni del beljakovin so tudi encimi kot so invertaza, amilaza in fosfataza (Serra-Bonvehi in Escola-Jorda, 1997; Nagai in sod., 2004; Human in Nicolson, 2006; Campos in sod., 2008).

Zaradi dodanega nektarja in medu je vsebnost ogljikovih hidratov v nabranem in skladiščenem cvetnem prahu bistveno višja kot v svežem (Human in Nicolson, 2006). Od polisaharidov v obnožini prevladuje škrob (Herbert in Shimanuki, 1978; Roulston in Cane, 2000; Campos in sod., 2008), od prostih sladkorjev pa prevladujejo fruktoza, glukoza in saharoza (Serra-Bonvehi in Escola-Jorda, 1997; Campos in sod., 2008).

Tudi vsebnost lipidov se med hrambo cvetnega prahu spreminja in močno niha glede na vrsto rastlin. Največ maščob vsebuje svež cvetni prah, najmanj pa cvetni prah obnožine. V svežem cvetnem prahu od nenasičenih maščobnih kislín prevladujejo linolna, linolenska in arahidonska kislina, v shranjenem pa poleg teh še palmitinska in oleinska kislina (Roulston in Cane, 2000; Human in Nicolson, 2006; Campos in sod., 2008).

Cvetni prah vsebuje veliko vodotopnih vitaminov, od katerih prevladujejo askorbinska kislina, nikotinska kislina in vitamini skupine B (Roulston in Cane, 2000; Nagai in sod., 2004). Vsebuje tudi pigmente, flavonoide, karotenoide in hormone (Nagai in sod., 2004). Vsebuje tudi širok spekter fenolov, ki imajo antioksidativne lastnosti (Baltrusaitytė in sod., 2007). Od mineralov prevladuje kalij, sledijo mu fosfor, kalcij, natrij, magnezij in drugi (Serra-Bonvehi in Escola-Jorda, 1997; Nagai in sod., 2004; Campos in sod., 2008).

Preglednica 1: Primerjava med hraničnimi vrednostmi svežega peloda, obnožine in čebeljega kruhka (Human in Nicolson, 2006: 1488)

Hranična vrednost	svež pelod	obnožina	čebelji kruhek
voda (%)	13	19	21
beljakovine (%)	51	31	28
maščobe (%)	10	5,5	8
minerali in vitamini (%)	4,5	3,6	3,6
ogljikovi hidrati (%)	35	60	61

Analize so pokazale, da so v obnožini prisotni reducirajoči sladkorji, kar pomeni, da že med zbiranjem čebele cvetnemu prahu dodajo med ali nektar (Casteel, 1912). Ugotovili so tudi, da se med hrambo hitro vrši hidroliza škroba in drugih sladkorjev (Herbert in Shimanuki, 1978). Čebele med pakiranjem cvetnega prahu dodajo izločke, ki vsebujejo encime amilazo, katalazo in druge (Campos in sod., 2008). Vsebnosti fosfataze in α -amilaze ter nekaterih aminokislín se v čebeljem kruhku zmanjšajo, kar bi lahko bil rezultat delovanja proteolitičnih encimov. Encimov celulaz, ki so sicer karakteristični za cvetni prah cvetočih rastlin, niso zaznali, zato sklepajo, da niso vpleteni v pretvorbo cvetnega prahu v čebelji kruhek (Standifer in sod., 1980). Čebeljemu kruhku se čez nekaj časa zniža pH, kar naj bi bila posledica mlečno kislinske fermentacije (Herbert in Shimanuki, 1978), saj so ugotovili, da čebelji kruhek vsebuje večjo vsebnost mlečne kislinske kot nabran cvetni prah in ta naj bi preprečila kvar (Nagai in sod., 2004).

V splošnem je sprejeto, da je čebelji kruhek posledica mlečnokislinske fermentacije, vendar točni mehanizmi pretvorbe niso popolnoma znani (Vasquez in Olofsson, 2009).

2.5 PRENOS MIKROORGANIZMOV

Viri mikrobiološke kontaminacije čebeljega kruhka v prvi vrsti vključujejo prebavni trakt čebel, vendar je potrebno upoštevati tudi druge dejavnike ekosistema, s katerimi čebele prihajajo v stik: zrak, zemljo, vodo, različne dele rastlin, cvetni prah, nektar, ipd. (Snowdon in Cliver, 1996). Mikrobiota je podvržena tudi vplivu fizikalnih dejavnikov okolja, ki se stalno spreminja zaradi vlage, temperature, svetlobe, idr. (Handelsman, 2002). Med opraševanjem so čebele v nenehnem stiku s cvetnim prahom in z mikroorganizmi cvetov (Brindza in sod., 2010; Shade in sod., 2013). V gosto naseljenem panju kot socialni organizmi pridejo v stik tudi z drugimi čebelami (Evans in Schwarz, 2011) ter si med seboj izmenjujejo hrano (Nixon in Ribbands, 1952; Haydak, 1970). Tako se ustvarja mreža različno pomembnih interakcij. Čebele so pravzaprav vektorji mikroorganizmov med okoljem in vsem, kar je povezano z njihovim panjem (Brindza in sod., 2010). Težko je določiti glavni vir okužbe z mikroorganizmi, saj gre za kompleksen sistem medsebojnih vplivov in je zato najverjetnejša navzkrižna okužba (Snowdon in Cliver, 1996; Brindza in sod., 2010; Shade in sod., 2013). Tudi biokemijske spremembe, ki se zgodijo med pakiranjem in hrambo, ter fizikalne in kemijske lastnosti cvetnega prahu in čebeljega kruhka vplivajo na sestavo prisotne mikrobiote (Gilliam, 1979a).

Pri opraševanju se bakterije naključno prenašajo, ko čebela leta s cveta na cvet. Bakterije, ki jih najdemo v cvetnem nektarju, se pogosto pojavljajo tudi v panju in v prebavnem traktu čebel. Bakterijska mikrobna združba mednega želodčka je najbolj podobna bakterijski združbi, ki jo najdemo v uskladiščenem cvetnem prahu in v medu (Anderson in sod., 2013). Primarni vir mikrobiote medu je mikrobiota čebeljega prebavnega trakta in cvetnega prahu (Snowdon in Cliver, 1996).

Za čebele je znano, da tvorijo kompleksne interakcije z različnimi mikroorganizmi (Snowdon in Cliver, 1996). Mikroorganizmi, ki so povezani s čebelami, so udeleženi v združbah na vsaj dveh nivojih: na enem gre za mikrobioto povezano s prebavnim traktom čebel, na drugem pa za mikrobioto t. i. razširjenega (super)organizma, ki vključuje mikroorganizme vseh čebel in celotnega čebelnjaka (Anderson in sod., 2011). Anderson in sodelavci (2011) so preučevali mikrobne interakcije znotraj prebavnega trakta in panja ter tudi interakcije med prebavnim traktom in panjem. Panj ni le dom razvijajočim se ličinkam in shramba hrane, temveč služi tudi za nišo simbiotskim mikrobnim združbam, ki pomagajo pri presnovi hrane ter čebele ščitijo pred vdorom patogenih mikroorganizmov (Anderson in sod., 2011).

V nadaljevanju so prikazani pregledi mikrobnih združb iz okolij, ki najverjetneje vplivajo na prenos tistih mikroorganizmov, ki prispevajo k sestavi mikrobiote čebeljega kruhka ter pripomorejo k pretvorbi cvetnega prahu v čebelji kruhek.

2.6 MIKROBIOTA CVETNEGA PRAHU

O mikrobi ni ekologiji cvetov ni veliko znanega. V dosedanjih študijah so se raziskovalci osredotočali predvsem na mikrobioto kvasovk in plesni na cvetovih in v nektarju cvetočih rastlin (Pozo in sod., 2011; Tadych in sod., 2012). Bakterijsko združbo cvetov hrušk in jablan so z gojitvenimi tehnikami preučevali Stockwell in sodelavci (1999) ter Pusey in sodelavci (2009). V obeh študijah so najpogosteje izolirali bakterije iz rodu *Pseudomonas*. Z molekularnimi tehnikami so Fridman in sodelavci (2012) preučevali bakterijsko združbo nektarja, ne pa tudi cvetnega prahu. Shade in sodelavci (2013) so na tem področju prvi, ki so z molekularnim pristopom izvedli raziskavo, v kateri so na cvetovih jablane preučevali mikrobno dinamiko in vrstno pestrost prisotnih mikroorganizmov. Pri tem so preučili mikrobioto venčnih in cvetnih listov ter pestičev in prašnikov (cvetnega prahu). Opazili so, da je mikrobiota zelo pестra in da se v času cvetenja postopoma spreminja.

Najznačilnejši bakterijski predstavniki cvetnega mikrobioma prihajajo iz debel *Proteobacteria*, *Actinobacteria* in *Bacteroidetes*. Nepričakovano so odkrili tudi člane bakterijskega debla *Deinococcus-Thermus*, ki so znani kot predstavniki, ki prenesejo močne okoljske strese. Odkrili so tudi sekvence arhej iz rodu *Methanosarcina* (Shade in sod., 2013).

2.7 MIKROBIOTA ČEBELJEGA PREBAVNega TRAKTA

Kaj vse vpliva na raznolikost mikrobiote čebeljega prebavnega trakta, ni popolnoma znano. Možnih je več vplivov, med drugim trofilaktičen odnos med čebelami, ki si med seboj izmenjujejo hrano in tako druga na drugo prenašajo tudi mikroorganizme. Ko se z rojenjem odcepi del družine, s seboj prenese mikroorganizme iz prejšnjega panja in kolonizira novega. Ključne so lahko tudi interakcije med roji, npr. pri ropu hrane iz sosednjih panjev ali mešanje družin, ki jih združi čebelar. Vse skupaj lahko vpliva na pestrost čebelje mikrobiote (Engel in sod., 2012).

Gastrointestinalni trakt odrasle čebele je kompleksen in dinamičen ekosistem, ki ga naseljuje vrsta različnih bakterij, ki s čebelami bivajo v simbiozi (Kačaniova in sod., 2009). Za rast črevesnih mikroorganizmov so nujno potrebna hranila, ki so prisotna v čebelji prehrani: nektarju, medu, cvetnem prahu in matičnem mlečku. Razpoložljivost teh nutrientov določa številčnost in raznolikost mikrobiote čebeljega prebavnega trakta (Anderson in sod., 2011). Sestava mikrobiote naj bi močno vplivala na rast, razvoj in zdravstveno stanje posamezne čebele in čebeljih družin (Babendreier in sod., 2007), zato so raziskovalci v svojih raziskavah že leli preučiti sestavo čebelje mikrobiote, kjer so se osredotočili na odkrivanje dominantnih nepatogenih bakterij, ki naseljujejo prebavni trakt čebel in nanje potencialno koristno vplivajo. Z molekularnimi tehnikami so ugotovili, da je mikrobiota čebeljega prebavnega trakta v primerjavi z mikrobioto drugih žuželk dokaj enostavna in manj pестra (Jeyaprakash in sod., 2003; Mohr in Tebbe, 2006; Babendreier in

sod., 2007; Cox-Foster in sod., 2007; Martinson in sod., 2011; Ahn in sod., 2012; Engel in sod., 2012; Moran in sod., 2012; Engel in sod., 2014).

Da bi lahko definirali sestavo čebelje črevesne mikrobiote, so raziskovalci uporabljali tako molekularne kot gojitvene tehnike ter analizirali čebele v različnih razvojnih stopnjah, različnih spolov ter iz različnih krajev in kontinentov (Crotti in sod., 2013). Glede na to, da so zbirali vzorce in analizirali čebeljo črevesno mikrobioto iz različnih konceptov sveta ter prišli do skoraj identičnih rezultatov, predvidevajo, da se je bakterijska črevesna mikrobiota med evolucijo razvijala skupaj s čebelami. Med generacijami se najverjetneje prenaša z izmenjavo hrane ter predstavlja relativno stabilno in bistveno komponento zdravih čebel (Anderson in sod., 2011; Martinson in sod., 2011; Moran in sod., 2012).

V čebeljem prebavnem traktu je prisotna značilna bakterijska mikrobiota, v kateri prevladujejo bakterije iz šestih glavnih filogenetskih skupin: iz debel *Firmicutes*, *Bacteroidetes* in *Actinobacteria* ter treh proteobakterijskih razredov, tj. *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria* (Jeyaprakash in sod., 2003; Mohr in Tebbe, 2006; Babendreier in sod., 2007; Cox-Foster in sod., 2007; Martinson in sod., 2011; Engel in sod., 2012; Moran in sod., 2012; Anderson in sod., 2013). V manjšini prisotne bakterijske vrste so najverjetneje prehodne, ki so jih čebele pridobile na cvetovih rastlin, kjer se potencialno pase mnogo čebel in je prenos toliko bolj mogoč (Martinson in sod., 2011).

Z razumevanjem sestave čebelje črevesne mikrobiote lahko dobimo boljši vpogled v razumevanje osnovne biologije čebel in njihov vpliv na api- in agrokulturo (Martinson in sod., 2011). V več nedavnih raziskavah so raziskovalci že leli definirati bakterijsko združbo čebeljega prebavnega trakta kot osnovo za preiskovanje koevolucije, ekologije in interakcij med mikroorganizmi in gostiteljem (Martinson in sod., 2011; Moran in sod., 2012). Domneva se, da bakterije igrajo glavno vlogo pri prehrani in obrambi proti patogenim mikroorganizmom, zato so nekatere izmed teh interakcij tudi preučili (Engel in sod., 2012). Profil mikrobne združbe zdravih in bolnih čebeljih kolonij se razlikuje, zato se je še toliko bolj uveljavilo prepričanje, da je ustaljena mikrobiota pomembna komponenta za zdravje čebel (Cox-Foster in sod., 2007). Zaradi gostote čebel in izmenjave hrane panj predstavlja ugodno okolje tudi za patogene mikroorganizme. S tem se poveča tveganje za okužbe, ki se lahko hitro širijo skozi celoten panj, zato je razumevanje in vzpostavitev značilne čebelje črevesne mikrobne združbe še toliko nujnejše (Martinson in sod., 2011).

Mlečnokislinske bakterije učinkujejo probiotično in delujejo kot glavni regulatorji čebeljega zdravja (Vasquez in sod., 2012). Mattila in sodelavci (2012) so v svoji raziskavi ugotovili, da prisotnost probiotičnih bakterij iz rodu *Bifidobacterium* bistveno zmanjša pojavnost patogenih bakterij iz rodu *Melissococcus*, ki sicer povzročajo t. i. pohlevno gnilobo čebelje zalege im. tudi evropska gniloba (ang. European foul brood), pri kateri pride do propadanja ličink. Bakterije iz rodu *Snodgrassella* tvorijo sloj na črevesnem epiteliju, nanj pa je pritrjen debel sloj bakterij iz rodu *Gilliamella* in tak biofilm naj bi

deloval kot obrambna linija proti invazivnim parazitom (Engel in sod., 2012). Nekateri člani črevesne mikrobiote, ki pripadajo družini *Acetobacteraceae* ter rodovom *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* in *Simonsiella*, proizvajajo kratkoverižne maščobne kisline ter mlečno kislino kot stranski produkt metabolizma ogljikovih hidratov. Asimilacija teh produktov lahko obogati čebeljo prehrano in prisrbi dodaten vir energije (Martinson in sod., 2011). Bakterije iz debel *Gammaproteobacteria* in *Firmicutes* ter iz rodu *Bifidobacterium* proizvajajo mnoge encime za razgradnjo ogljikovih hidratov in metabolizem različnih sladkorjev (Engel in sod., 2012). Z metagenomsko preiskavo so odkrili tudi številne gene, ki kodirajo encime za razgradnjo polisaharidov rastlinske celične stene, predvsem pektina. Razgradnja pektina naluknja celično steno peloda, iz katerega se hitreje sprosti bogata hranilna vsebina (Engel in sod., 2012). Mattila in sodelavci (2012) so v svoji raziskavi ugotovili, da 67 % najaktivnejših članov mikrobiote čebeljega prebavnega trakta pripada po Gramu negativnim bakterijam iz rodu *Succinivibrio* (razred *Gammaproteobacteria*) ter po Gramu pozitivnim bakterijam iz rodu *Oenococcus*, *Paralactobacillus* (debelo *Firmicutes*) in *Bifidobacterium* (debelo *Actinobacteria*).

2.8 MIKROBIOTA ČEBELJEGA KRUHK

Dr. Martha Gilliam (1979a, 1979b) in sodelavci (1989) so objavili prve raziskave, v katerih so z gojitvenimi metodami žeeli identificirati mikrobioto cvetnega prahu na več stopnjah. Preučevali so mikrobioto svežega cvetnega prahu, obnožine in čebeljega kruhka ter tudi čebeljega prebavnega trakta. Vse izolate so biokemijsko analizirali in ugotovili, da se mikrobiota na vseh stopnjah močno razlikuje in se med hrambo njihovo število zmanjša. Vendar se lahko iste vrste mikroorganizmov pojavljajo tako v obnožini kot v čebeljem kruhku in čebeljem prebavnem traktu. Najbolj se razlikuje mikrobiota svežega cvetnega prahu in čebeljega kruhka, medtem ko so na obnožini prisotni t. i. prehodni mikroorganizmi - enkrat enaki tistim s cvetnega prahu, drugič tistim s čebeljega kruhka. Iz tega podatka je razvidno, da so čebele tiste, ki mikrobioto cvetnega prahu pomešajo z mikroorganizmi izbljuvanega nektarja in medu, ko cvetni prah vlažijo in pakirajo v koške zadnjih nog za prenos v panj. Razmere v panju se spreminja in niso vedno naklonjene vsem članom prisotne mikrobiote, zato se med hrambo spreminja tudi s panjem povezana mikrobiota. Mikroorganizmi v cvetnem prahu in čebeljem kruhku so metabolno aktivni in lahko proizvajajo biološko aktivne snovi, npr. encime, vitamine, protimikrobne snovi, organske kisline ipd., ki bi lahko prispevale pri pretvorbi cvetnega prahu v čebelji kruhek (Gilliam, 1979a; Gilliam 1979b; Gilliam in sod., 1989). Mehanizmi biokemijske pretvorbe niso popolnoma znani, čeprav je obveljalo prepričanje, da je čebelji kruhek posledica fermentacije različnih mikroorganizmov (Gilliam, 1997; Vasquez in Olofsson, 2009). Anderson in sodelavci (2014) nasprotujejo tej teoriji, saj so mnenja, da je v čebeljem kruhku prisotnih premajhno število bakterij, ki bi lahko izvajale fermentacijo, ki bi bistveno pripomogla k višji hranilni vrednosti in biokemijski pretvorbi čebeljega kruhka.

Vasquez in Olofsson (2009) sta identificirala mlečnokislinske bakterije iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki v čebelji kruhek pridejo preko izbljuvanega nektarja iz mednega želodčka čebel delavk. Te bakterije načeloma med fermentacijo tvorijo velike količine mlečne kisline in protimikrobnih snovi, zato imajo domnevno velik vpliv na daljšo obstojnost čebeljega kruhka ter tudi pri obrambi čebel proti patogenim organizmom (Vasquez in Olofsson, 2009).

Čebelji kruhek se biokemijsko razlikuje od svežega cvetnega prahu, kar so rutinsko pripisali mlečnokislinski fermentaciji (Herbert in Shimanuki, 1978; Gilliam, 1997; Vasquez in Olofsson, 2009), čeprav prisotnosti metabolno aktivnih mikroorganizmov, ki bi sodelovali pri biokemijski pretvorbi cvetnega prahu v čebelji kruhek, niso nikoli prepričljivo dokazali (Mattila in sod., 2012). Večina starejših študij je temeljila na izolaciji in gojenju bakterij (Gilliam, 1997; Kačanova in sod., 2009; Vasquez in Olofsson, 2009). Pristope kloniranja in sekvenciranja gena za 16S rRNA so uporabili le pri preučevanju čebelje črevesne mikrobiote, ne pa tudi čebeljega kruhka (Jeyaprakash in sod., 2003; Babendreier in sod., 2007; Cox-Foster in sod., 2007; Martinson in sod., 2012). Problemi, ki se pojavljajo pri uporabi gojitvenih tehnik so, da zmoremo gojiti le majhen del prisotne populacije mikroorganizmov, pri molekularnih tehnikah pa ne moremo razlikovati med temi, ki aktivno sodelujejo pri pretvorbi cvetnega prahu in med tistimi, ki so metabolno neaktivni (Mattila in sod., 2012). Zato so Mattila in sodelavci (2012) opravili raziskavo, kjer so kot odraz mikrobne aktivnosti izolirali in preučili bakterijsko RNA, Anderson in sodelavci (2013) pa so izvedli raziskavo, v kateri so s primerjalnim pristopom gojitvenih in molekularnih tehnik skušali temeljiteje opisati mikrobiotno sestavo in pestrost čebeljega kruhka. Rezultati teh raziskav so opisani v nadaljevanju.

Nekatere bakterije, ki naseljujejo čebelji prebavni trakt, se pojavljajo tudi na rastlinah, v nektarju, medu, čebeljem kruhku in tudi v mednem želodčku (ki je sicer del prebavnega trakta, vendar načeloma ni vpleten v prebavo, temveč služi za prenos medičine s cveta v panj). Lahko se prenašajo iz enega okolja v drugega in ta okolja naj bi zanje predstavljalata sekundarno nišo (Anderson in sod., 2013). Čebelji kruhek in čebelji prebavni trakt vsebuje približno 10 % skupnih bakterij (Mattila in sod., 2012).

Anderson in sodelavci (2013) so odkrili, da največji del mikrobiote čebeljega kruhka predstavljajo bakterije iz vrste *Lactobacillus kunkeei*, bakterije iz družine *Acetobacteraceae* in bakterije iz razreda *Actinobacteria*, vendar Mattila in sodelavci (2012) opozarjajo, da številčnost bakterij še ne pomeni, da so te bakterije tudi najbolj metabolno aktivne in v svojih rezultatih objavljajo, da najaktivnejši člani mikrobiote čebeljega kruhka pripadajo debлом *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* in *Bacteroidetes*.

Raziskovalci domnevajo, da je atmosfera v čebeljem kruhku vsaj na nekaterih predelih anaerobna, saj so v njem odkrili tudi nekaj fakultativnih in obligatnih anaerobov. Aerotolerantne bakterije kot so bakterije iz družine *Acetobacteraceae* in nekatere bakterije

iz razreda *Actinobacteria* imajo morda pomembno vlogo pri konzerviranju čebeljega kruhka na mejni ploskvi s kisikom (Anderson in sod., 2013). Čeprav Anderson in sodelavci (2013) poročajo tudi o bakterijah iz družine *Acetobacteraceae*, jih Mattila in sodelavci (2012) niso zaznali med mikroorganizmi, ki naj bi aktivno sodelovali pri procesu zorenja čebeljega kruhka.

Zaradi sposobnosti presnavljanja celuloze so bakterije iz debla *Actinobacteria* lahko patogene za rastline, v splošnem pa so sprejete kot obrambni mutualisti insektov, ker proizvajajo sekundarne metabolite, ki preprečujejo rast gliv in drugih patogenih organizmov. Verjetno se prenašajo neposredno z rastlin ali iz zemlje, prisotne pa so v čebeljem kruhku, vosku in prebavnem traktu ličink in odraslih čebel. Najverjetnejše preprečujejo razrast plesni in kvasovk ter pripomorejo k daljši obstojnosti čebeljega kruhka. Glavni predstavniki so iz rodov *Streptomyces*, *Propionibacterium*, *Mycobacterium* in *Corynebacterium* (Anderson in sod., 2013).

Mattila in sodelavci (2012) so ugotovili, da so v zakisanem čebeljem kruhku metabolno najaktivnejše mlečnokislinske bakterije iz rodov *Oenococcus*, *Paralactobacillus* (deblo *Firmicutes*) ter predstavniki iz rodu *Bifidobacterium* (deblo *Actinobacteria*). Predlagali so teorijo, da se zaradi zakisanosti okolja pospeši hidroliza hemiceluloze pelodnih sten v disaharide, ki jih potencialno lahko pretvarjajo drugi člani mikrobiote, hranična vsebina zrnc cvetnega prahu pa je tako tudi za čebele lažje dostopna (Mattila in sod., 2012).

Lactobacillus kunkeei je bila vrsta, ki so jo najpogosteje izolirali iz vzorcev mednega želodčka, črevesja, medu, nektarja in čebeljega kruhka. Anderson in sodelavci (2013) pristajajo na to, da je pojavljanje bakterij *Lactobacillus kunkeei* v mednem želodčku in črevesju posledica uporabe metod izolacije z gojenjem, saj sekvenc teh bakterij v mnogih molekularnih študijah niso zaznali ali pa jih je bilo zelo malo (Martinson in sod., 2011; Engel in sod., 2012; Moran in sod., 2012). Pojavljanje teh bakterij v čebeljem kruhku pa zaznajo tako gojitvene kot tudi molekularne tehnike. Na podlagi rezultatov uporabe molekularnih tehnik lahko sklepamo, da so bakterije vrste *Lactobacillus kunkeei* dejansko prisotne le v čebeljem kruhku, ne pa tudi v čebeljem črevesju in mednem želodčku oziroma so tam le v zelo majhnem številu (Anderson in sod., 2013). Te bakterije se v naravi pojavljajo kot dominantni fruktofili, ki naseljujejo okolja, bogata s fruktozo. Med takšna okolja spadajo tudi cvetovi, nektar in med (Endo in Salminen, 2013), s katerimi so čebele v tesnem stiku, zato obstaja velika verjetnost, da jih čebele zanesajo v panj. To domnevo potrjujejo trditve raziskovalne skupine Andersona in sodelavcev (2013), ki so identične sekvence izolatov bakterij *Lactobacillus kunkeei* zaznali tako na nekaterih cvetovih kot tudi v črevesju čebel in v čebeljem kruhku. To pomeni, da je po vsej verjetnosti prišlo do prenosa teh bakterij iz okolja (cvetov) v panj (čebelji kruhek). Ker pa je čebeljemu kruhku dodan tudi vir fruktoze v obliki izbljuvanega nektarja in medu, najbrž čebelji kruhek za te bakterije predstavlja s hrani bogatejšo in s tem stabilnejšo nišo od cvetov in prebavnega trakta čebel (Anderson in sod., 2013).

Čebele so odvisne od mutualističnih mikroorganizmov, saj ti prispevajo k hranilni vrednosti čebelje prehrane ter jih s kolonizacijo in tvorbo protimikrobnih snovi varujejo pred vdorom patogenih mikroorganizmov. Ker je za čebele čebelji kruhek hranljivejši od svežega cvetnega prahu, njegova mikrobiota deluje kot razširjen del čebeljega prebavnega trakta čebelje družine in zaradi mikrobne aktivnosti so teh koristi deležni vsi člani čebelje družine (Mattila in sod., 2012).

2.9 PRISTOPI K PREUČEVANJU ČEBELJE MIKROBIOTE

Mikrobioto čebeljega prebavnega trakta so sprva raziskovali s tradicionalnimi mikrobiološkimi tehnikami, ki so temeljile na gojenju mikroorganizmov in nato na analizah morfoloških značilnosti in biokemijskih testov (Gilliam, 1997; Kačaniova in sod., 2009). Eden od razlogov, da ne moremo gojiti vseh prisotnih mikroorganizmov iz neke mikrobne združbe, je nedvomno pomanjkanje informacij o dejanskih razmerah, v katerih bakterije rastejo v njihovih naravnih habitatih (Muyzer in Smalla, 1998). Z razvojem molekularnih metod so se močno povečale možnosti za podrobnejšo analizo mikrobnih združb. Natančno poznavanje t. i. 'mikrobioma' odkriva nov vpogled v identiteto, dinamiko in medsebojno sodelovanje prisotnih mikroorganizmov z rastlinami in njihovimi opaševalci. Molekularne tehnike, ki so neodvisne od izolacije in gojenja mikroorganizmov in s katerimi lahko izoliramo in analiziramo DNA neposredno iz okolja, pomagajo bolje razumeti kompleksne mikrobne sisteme v naravi (Shade in sod., 2013). V novejših raziskavah mikrobiote čebeljega prebavnega trakta so z molekularnimi tehnikami analizirali sekvence bakterijskih genov za 16S rRNA z metodami SSCP (Mohr in Tebbe, 2006), RFLP (Jeyaprakash in sod., 2003), T-RFLP (Babendreier in sod., 2007), s klonskimi knjižnicami (Martinson in sod., 2011), pirosekvensiranjem (Moran in sod., 2012; Shade in sod., 2013; Mattila in sod., 2012) in z metagenomskimi pristopi (Cox-Foster in sod., 2007; Engel in sod., 2012). V primerjavi s starejšimi gojitvenimi raziskavami so odkrili veliko večjo pestrost mikroorganizmov v čebeljem prebavnem traktu (Jeyaprakash in sod., 2003; Mohr in Tebbe, 2006; Babendreier in sod., 2007; Martinson in sod., 2011; Moran in sod., 2012).

Raziskave, ki so temeljile na gojitvenih metodah, so praviloma pokazale prevladovanje bakterij iz rodu *Bacillus* v čebeljem prebavnem traktu in čebeljem kruhku (Gilliam, 1979b; Gilliam 1997), medtem ko molekularne tehnike razkrivajo, da se te bakterije tam pojavljam le sporadično (Mohr in Tebbe, 2006; Babendreier in sod., 2007; Anderson in sod., 2013). Pogosto pojavljanje bakterij iz rodu *Lactobacillus* pa so potrdili z obema pristopoma (Gilliam, 1997; Babendreier in sod., 2007; Vasquez in sod., 2012; Anderson in sod., 2013).

Tako kot gojitvene imajo tudi molekularne tehnike svoje slabosti in omejitve. Zaradi uporabe različnih metodologij prihaja do zmede in rezultati pogosto niso primerljivi. Metode vzorčenja, izolacije in pomnoževanja DNA lahko močno vplivajo na končni izid sestave mikrobiote, zato je profiliranje mikrobnih združb, ki temeljijo na takšnem pristopu, potrebno kritično spremljati (Anderson in sod., 2011).

Pri strategijah vzorčenja se lahko ustvarjajo razlike zaradi različnih mest jemanja vzorcev in pogostosti vzorčenja (Anderson in sod., 2011). Vključitev izocima v protokol za izolacijo skupne mikrobne DNA odkriva bakterijsko združbo, ki je bogatejša s po Gramu pozitivnimi bakterijami (Martinson in sod., 2011; Mattila in sod., 2012), izbira začetnih oligonukleotidov, npr. za 18S, pa odkriva prisotnost glivnih združb (Cox-Foster in sod., 2007). Nedosledne strategije vzorčenja, izolacije in pomnoževanja DNA lahko močno popačijo sliko sestave preučevane mikrobiote (Anderson in sod., 2011).

Zaradi različnih pristopov tako dobimo različne rezultate tudi glede količinske sestave mikroorganizmov neke mikrobiote, zato ne moremo primerjati števila določenih taksonov med študijami, v katerih so uporabljali različne protokole (Moran in sod., 2012). Poleg tega molekularne tehnike, s katerimi preučujemo mikrobno DNA, ne podajajo informacij o pomembnosti posameznih mikroorganizmov ter o funkcionalni in aktivni vlogi mikrobiote v določeni niši (Mattila in sod., 2012; Vasquez in sod., 2012). Na osnovi rezultatov, ki jih pridobimo z molekularnimi tehnikami, ne moremo razlikovati med bakterijami, ki aktivno pripomorejo pri pretvorbi cvetnega prahu v čebelji kruhek in med tistimi, ki so v njem prisotne v manjšini oz. so le prehodne. Zato mikroorganizmi, ki so odgovorni za pretvorbo cvetnega prahu v čebelji kruhek v večini še vedno ostajajo skrivnost (Mattila in sod., 2012).

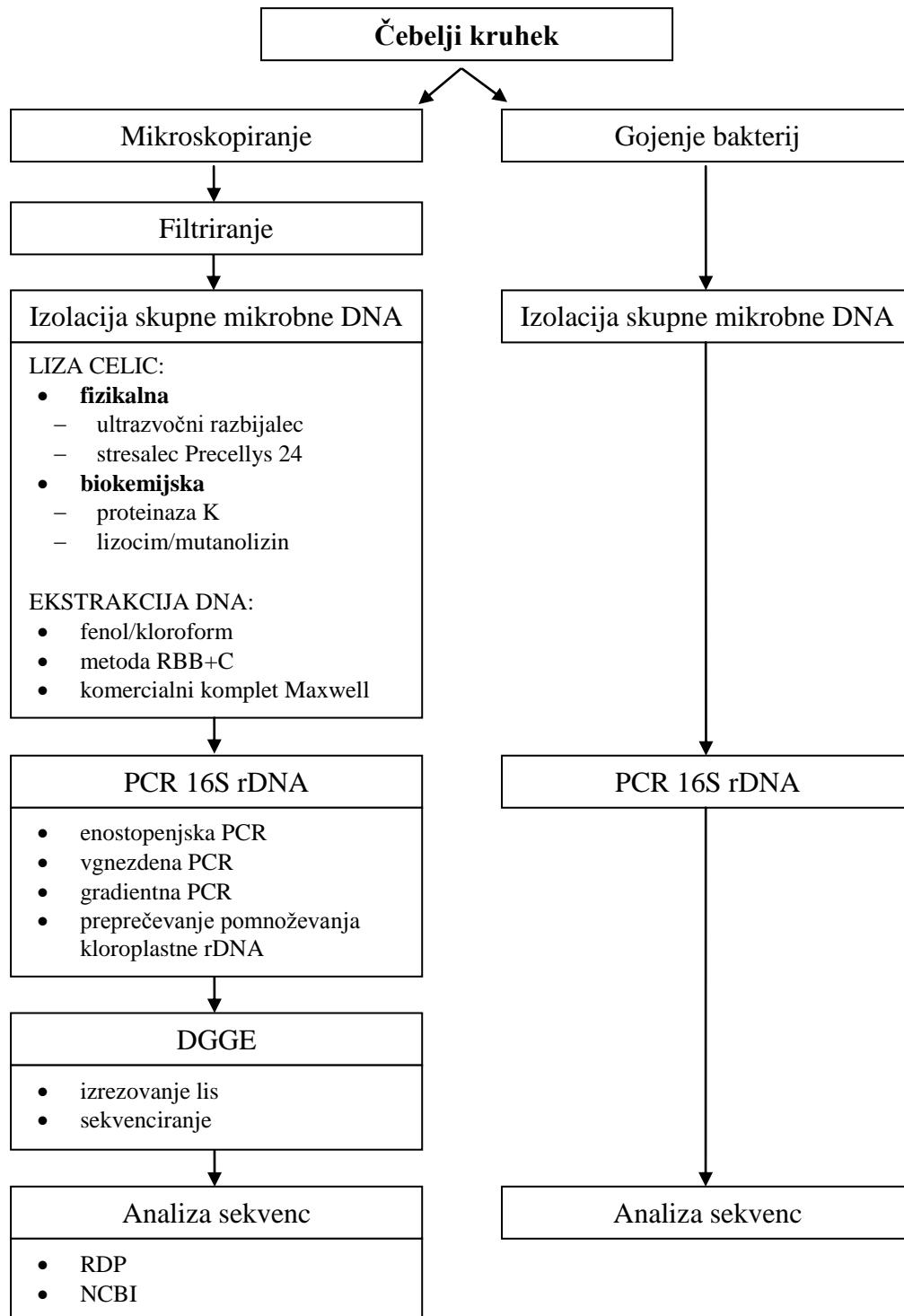
2.10 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA Z GRADIENTOM DENATURANTA (DGGE)

Muyzer je s sodelavci leta 1993 vpeljal nov molekularni pristop v študije genske raznolikosti v kompleksnih mikrobnih populacijah. Osnova za poliakrialmidno gelsko elektroforezo z gradientom denaturanta (ang. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) je predhodna izolacija skupne mikrobne DNA iz vzorca in pomnožitev specifičnega odseka 16S rDNA z metodo PCR. Tehnika temelji na ločevanju enako velikih pomnožkov PCR, ki se med seboj ločijo glede na interno sekvenco v poliakrilamidnem gelu, ki vsebuje linearno naraščajoč gradient denaturanta iz uree in formamida. Pomnožki PCR so enako dolgi, vendar jih lahko ločimo zaradi različne sestave sekvenc, še posebej glede na prisotnost regij z nizko oz. visoko talilno temperaturo, tj. takšnih, ki so bogate z AT- oz. GC-pari. To omogoča ločevanje med različnimi mikrobnimi vrstami. Za optimalno ločevanje pomnožkov v gradientu denaturanta je nujna priključitev 40-bp dolge verige z bogato vsebnostjo GC-parov, t. i. GC-zanko (ang. GC-clamp) na 5'-konec enega od začetnih oligonukleotidov. Ta veriga je odporna na denaturacijo in povzroči, da se verigi DNA ne razkleneta popolnoma v dve enoverižni molekuli (ssDNA), ki bi v gelu potovali hitreje. Elektroforeza poteka v smeri naraščajočega denaturanta. Ko molekula zaradi specifične sestave sekvenc podleže delovanju denaturanta, se razklene in ustavi kot delno denaturirana stabilna molekula. Rezultat je vzorec elektroforeznih lis, ki ponazarja profil pomnožkov ribosomskih genov z različnimi internimi sekvencami, tj. različnih vrst bakterij, ki sestavlajo neko mikrobno združbo. Pozicija in relativna intenziteta posamezne

lise v kvalitativnem in semikvantitativnem smislu prikazujeta prisotnost in relativno pogostnost posamezne vrste v združbi. S to tehniko lahko zaznamo tudi vrste, ki predstavljajo manjši del mikrobne združbe, a vsaj 1 % preučevane populacije. Problem, ki se lahko pojavi pri analizah profilov DGGE je, da lise na identičnih pozicijah v gelih DGGE ne izhajajo nujno iz iste mikrobne vrste, zato bi v takšnem primeru morali vpeljati drugačen gradient denaturanta, da bi izboljšali ločevanje oz. t. i. resolucijo DGGE profilov. Prav tako s tehniko DGGE ne dobimo neposrednih informacij o taksonomski sestavi mikrobne populacije, lahko pa v nadaljevanju DNA relativno enostavno izrežemo iz gela DGGE, jo ponovno pomnožimo z metodo PCR in sekvenciramo. Zato je DGGE kljub vsemu dokaj hiter in učinkovit pristop za analizo sestave mešanih mikrobnih populacij iz naravnih okolij (Muyzer in sod., 1993).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 5: Shema dela

3.2 MATERIALI

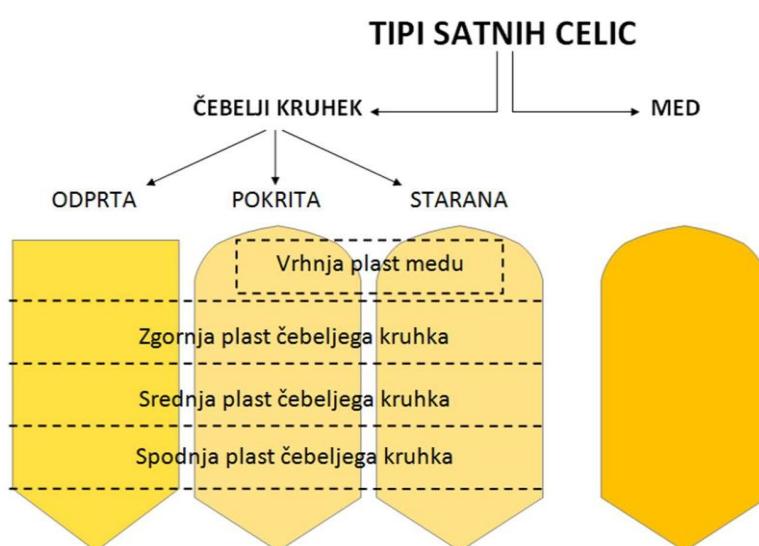
3.2.1 Vzorci

Na začetku analize in med optimizacijo metod za izolacijo mikrobne DNA ter izvedbo PCR in DGGE smo uporabljali t. i. testne vzorce, od katerih smo nekatere pripravili sami, druge pa nam je odstopil Blaž Podrižnik z Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Ti vzorci so bili pripravljeni tako, da so čebelji kruhek kostanjeve paše iz satnih celic izrezali s sterilnim skalpelom ter ga razdelili na tretjine (spodnja, srednja in zgornja tretjina). Pri nekaterih so odvzeli tudi med, ki je prekrival cvetni prah (slika 6). Po tehtanju so vzorcem glede na maso posamezne tretjine čebeljega kruhka dodali enako količino sterilne destilirane vode, premešali in 5 minut centrifugirali pri $1500 \times g$. $10 \mu l$ supernatanta so porabili za analizo skupne vsebnosti fenolov, preostali supernatant so uporabili za testiranje protimikrobske aktivnosti (Podrižnik in Božič, 2014). Usedlino so glede na maso resuspendirali z 0,9 % NaCl (20 % volumna), pomešali in odvzeli $3 \mu l$ za mikroskopsko analizo peloda. Preostalo usedlino so zamrznili in namenili za molekularno analizo mikrobiote čebeljega kruhka.

Vzorci za končno analizo pri nalogi so se od testnih razlikovali po tem, da so pri njih v supernatantu izmerili tudi vsebnost mlečne kisline.

Nekaj testnih vzorcev smo pripravili sami tako, da smo iz čebeljega satja, ki nam ga je podaril izr. prof. dr. Janko Božič (Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo), s sterilnim skalpelom izrezali več čebeljih kruhkov, tj. vsebin posameznih satnih celic in jih združili. S tem smo zagotovili homogenost vzorcev ter tako pridobili več materiala za delo. Tako pripravljen material smo razdelili v alikvote in shranili pri $-20^{\circ}C$ za nadaljnje analize.

Vzorci, ki smo jih uporabili pri nalogi, so natančneje opredeljeni v prilogah A, B in C.



Slika 6: Shematski prikaz vzorčenja čebeljega kruhka, ki je bil razdeljen na posamezne tretjine (spodnja, srednja, zgornja tretjina), pri nekaterih je bil vzorčen tudi med nad cvetnim prahom (prirejeno po Podrižnik in Božič, 2014)

3.2.2 Reagenti

Preglednica 2: Pregled uporabljenih reagentov za izolacijo DNA, PCR, gelsko elektroforezo in DGGE

REAGENTI	PROIZVAJALEC
Za izolacijo DNA	
NaCl	Merck, Nemčija
CTAB	Sigma-Aldrich, ZDA
kloroform	Merck, Nemčija
fenol:kloroform:izoamil alkohol 25:24:1 (pH 8,0)	Calbiochem, ZDA
izopropanol	Merck, Nemčija
70 % etOH	Merck, Nemčija
EDTA	Merck, Nemčija
SDS	Merck, Nemčija
amonijev acetat	Sigma-Aldrich, ZDA
RNaza	Fermentas, ZDA
proteinaza K	Thermo Sientific, ZDA
lizocim	Sigma-Aldrich, ZDA
mutanolizin	Sigma-Aldrich, ZDA
komercialni komplet za izolacijo DNA: Maxwell 16 Tissue DNA Purification kit	Promega, ZDA
Za verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	
začetni oligonukleotidi: FD1, 926R, NadkarniR, HDA1-GC, HDA2	Microsynth, Švica
dNTP mix	Fermentas, ZDA
MgCl ₂	Fermentas, ZDA
<i>Taq</i> pufer	Fermentas, ZDA
<i>Taq</i> -polimeraza	Fermentas, ZDA
voda brez nukleaz	Sigma-Aldrich, ZDA
komercialni komplet za čiščenje produktov reakcije PCR: High Pure PCR Product Purification Kit	Fermentas, ZDA
Za agarozno gelsko elektroforezo	
SeaKem® LE agaroha	Lonza, ZDA
velikostni standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, ZDA
EtBr	Sigma-Aldrich, ZDA
Za poliakrilamidno gelsko elektroforezo DGGE	
urea	Merck, Nemčija
formamid	Fluka, Švica
96 % CH ₃ COOH	Merck, Nemčija
Poliakrilamid: mešanica akrilamida in bisakrilamida z razmerjem 37:1	Sigma-Aldrich, ZDA
APS	Sigma-Aldrich, ZDA
TEMED	Sigma-Aldrich, ZDA
Kemex (sredstvo za ročno pranje laboratorijskega pribora)	Kemika, Hrvaška
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Invitrogen, Velika Britanija

3.2.3 Pufri in raztopine

Preglednica 3: Pregled in sestava uporabljenih pufrov in raztopin

PUFER/RAZTOPINA	SESTAVA	PROIZVAJALEC
CTAB/NaCl	10 % CTAB 0,7 M NaCl	Sigma-Aldrich, ZDA Merck, Nemčija
Pufer PBX	13 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄	Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija
Pufer TE (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0)	Merck, Nemčija Merck, Nemčija
Pufer TAE 50x	40 mM Tris 20 mM CH ₃ COOH 1 mM EDTA	Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija
Pufer TBE 0,5x	0,045 M Tris 0,045 M H ₃ BO ₃ 1 mM EDTA	Merck, Nemčija Merck, Nemčija Merck, Nemčija
Nalagalni pufer za agarozni gel	0,25 % bromfenol modro 40 % saharoze	Serva, Nemčija Kemika, Hrvaska
Nalagalni pufer za DGGE	0,05 % bromfenol modro 0,05 % ksilen cianol 70 % glicerol	Serva, Nemčija Sigma-Aldrich, ZDA Sigma-Aldrich, ZDA

3.2.4 Mikrobiološka gojišča in bakterijske kulture

Preglednica 4: Pregled uporabljenih bakterijskih kultur in mikrobioloških gojišč

BAKTERIJSKI SEV	GOJENJE V GOJIŠČU
<i>Escherichia coli</i> K12 (DSM 18039)	tekoče gojišče BHI (ang. Brain Heart Infusion) (Biolife, Italija)
<i>Prevotella bryantii</i> B14 (DSM 11371)	tekoče gojišče BHI (ang. Brain Heart Infusion) (Biolife, Italija)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> 1612A (DSM 15643)	modificirano tekoče gojišče 104.PYG
gojenje bakterij iz čebeljega kruhka	trdno gojišče NA (ang. Nutrient Agar) (Sigma-Aldrich, ZDA), trdno gojišče MRS (po De Man, Rogosa, Sharpe) (Merck, Nemčija)

3.2.5 Laboratorijska oprema

Preglednica 5: Pregled laboratorijske opreme

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
polavtomatske pipete: Finnpipette	Thermo Scientific, ZDA
mikroskop: Olympus BX50	Olympus, Japonska
avtoklav A-21CA	Kambič laboratorijska oprema, Slovenija
filtri s premerom por 5 µl: Minisart	Sartorius Stedim, Nemčija
cirkonijeve kroglice: Bead Beat	BioSpec, ZDA
tehtnice: PN163 in P1210	Mettler Toledo, Slovenija
ultrazvočni razbijalec celic: MSE Soniprep 150	Sanyo Gallenkamp, Velika Britanija
stresalec za razbijanje celic: Precellys 24	Bertin Technologies, Francija
centrifuga s hlajenjem: MIKRO 200R	Hettich, Nemčija
centrifuga: MINI SPIN PLUS	Eppendorf, Nemčija
vrtinčno mešalo: VORTEX-GENIE 2	Scientific Industries, ZDA
termoblok: CH-100 BIOSAN	Chemas d.o.o., Slovenija
komora za pripravo PCR mešanic: DNA in RNA FREE CHAMBER	Biosan, Latvija
ciklični termostat: MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad, ZDA
ciklični termostat: Supercycler Trinity	Kyratec, Avstralija
elektroforezna kad: MINI-SUB in WIDE MINI-SUB CELL GT	Bio-Rad, ZDA
naprava za fotografiranje gelov v UV-spektru: Gel Doc 1000	Bio-Rad, ZDA
spektrofotometer za DNA: NanoVue™	GE Healthcare, ZDA
spektrofotometer: Novaspec II	Biochrom, Velika Britanija
DGGE sistema: D GENETM SYSTEM Denaturing Gel Electrophoresis in DCODETM Universal Mutation Detection System	Bio-Rad, ZDA
UV-transluminator: ChemiGenious ² Bio-Imaging Gel Doc System	Syngene, Velika Britanija

3.2.6 Računalniški programi

Preglednica 6: Pregled uporabljenih računalniških programov

RAČUNALNIŠKI PROGRAM	PROIZVAJALEC
za slikanje in delo z agaroznimi geli Gel Doc 1000: Molecular Analyst 1.5	Bio-Rad, ZDA
za slikanje gelov DGGE: GeneSnap	Syngene, Velika Britanija
Microsoft Office Excel	Microsoft, ZDA
BioEdit Sequence Alignment Editor©7.0.9.0	Ibis Biosciences, ZDA

3.3 METODE

3.3.1 Gojenje in analiza bakterij iz čebeljega kruhka

Iz dveh celic satja (X, Y) smo sterilno izrezali čebelji kruhek in vsakega posebej prenesli v sterilno mikrocentrifugirko. Čebelji kruhek iz celice X je tehtal 30 mg, iz celice Y pa 23 mg. V obe mikrocentrifugirki smo dodali 750 µl redčitvenega gojišča (pepton 0,25 % (w/v), cistein 0,05 % (w/v), resazurin 0,1 % (v/v)) ter v redčitvah do 10^{-3} nacepili na gojišča NA in MRS. Gojišča NA smo inkubirali aerobno in v anaerobni komori 24 ur pri 37 °C. Gojišča MRS smo inkubirali anaerobno 3 dni pri 37 °C. Zrasle kolonije smo precepili do čistih kultur. DNA čistih kultur smo izolirali tako, da smo čisto kolonijo postrgali z agarske plošče in jo dali v mikrocentrifugirko, dodali 50 µl pufra TE ter 10 minut inkubirali v vodni kopeli pri 23 °C. Po inkubaciji smo 10 minut centrifugirali pri 14 000 x g ter supernatant prenesli v svežo mikrocentrifugirko. 1 µl supernatanta smo uporabili kot matrico v reakciji PCR, v kateri smo uporabili par začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R. Produkte reakcije PCR smo očistili s komercialnim kompletom High Pure PCR Product Purification Kit ter poslali na sekvenciranje v podjetje Microsynth v Švico.

3.3.2 Priprava bakterijskih kultur *E. coli* K12, *P. bryantii* B₁4 in *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* 1612A

Bakterijski sev *E. coli* K12 smo gojili v tekočem gojišču BHI aerobno 24 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo s spektofotometrom pri valovni dolžini 654 nm izmerili optično gostoto kulture *E. coli* K12 (OD = 0,781, predvideno okoli 10^9 bakterijskih celic). Po inkubaciji smo kulturo alikvotirali v nekaj mikrocentrifugirk in 10 minut centrifugirali pri 6500 x g. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, da smo pridobili celično biomaso, ki je kasneje služila za pozitivno kontrolo izolacije DNA in PCR.

Bakterijska seva *P. bryantii* B₁4 in *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* 1612A smo gojili v tekočem gojišču BHI anaerobno v skladu z Bryantovo modifikacijo Hungatove tehnike (Bryant, 1972). Celično biomaso smo pridobili na enak način, kot je opisano zgoraj.

3.3.3 Priprava vzorcev za izolacijo skupne bakterijske DNA

Pripravljeno zamrznjeno usedlino čebeljega kruhka smo odtalili na sobni temperaturi. Posameznemu vzorcu usedline smo dodali 500 µl pufra PBX ter filtrirali skozi filter Minisart (Sartorius Stedim, Nemčija) s premerom por 5 µm. Postopek smo še dvakrat ponovili, da smo mikrocentrifugirko, v kateri je bila usedlina, popolnoma sprali, prav tako pa smo s takšno količino pufra PBX s filtra sprali tudi morebitne bakterijske celice, ki bi lahko bile pritrjene na stene zrnc cvetnega prahu. Ker nekaj tekočine zadrži tudi filter, smo na koncu dobili nekaj manj kot 1500 µl filtrata. Filtrat smo 10 minut centrifugirali pri 6500 x g in odstranili supernatant, da smo dobili celično biomaso, iz katere smo nameravali izolirati skupno bakterijsko DNA. Tako pripravljene vzorce smo do nadaljnje obdelave shranili pri -20 °C in jih pred izvedbo izolacije DNA resuspendirali v 600 µl pufra TE.

3.3.4 Izolacija bakterijske DNA

Osnovni protokol:

A. Bakterijske celice smo lizirali z ultrazvočnim razbijalcem celic z amplitudo 5 v treh ciklih s 30-sekundnim delovanjem in 15-sekundnim premorom (3x30x15), med katerim smo vzorce shranjevali na ledu. Nato smo vzorcem dodali 100 µl 5 M NaCl ter jih rahlo premešali. Dodali smo še 80 µl raztopine 10 % CTAB in 0,7 M NaCl ter 10 minut inkubirali pri temperaturi 65 °C. Po inkubaciji smo dodali 600 µl kloroforma, premešali in centrifugirali 10 minut pri 10 000 x g pri temperaturi 4 °C. Zgornjo, vodno fazo smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in jim dodali 500 µl mešanice fenol:kloroform:izoamil alkohol v razmerju 25:24:1 (pH 8), premešali in centrifugirali 15 minut pri 10 000 x g pri 4 °C. Znova smo prenesli vodno fazo v novo mikrocentrifugirko in dodali 500 µl kloroforma, premešali in centrifugirali 10 minut pri 10 000 x g pri 4 °C. Vodno fazo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko ter DNA oborili s 300 µl izopropanola ter centrifugirali 10 minut pri 14 000 x g pri 4 °C. Odstranili smo supernatant in oborino sprali s 500 µl hladnega 70 % etanola. Znova smo centrifugirali 10 minut pri 14 000 x g pri 4 °C, odstranili supernatant ter oborino osušili ob gorilniku. Tako izolirano DNA smo raztopili v 15 µl pufra TE in shranili pri -20 °C do nadaljnje obdelave.

Modifikacije:

B. Tudi pri tem postopku smo za lizo celic uporabili ultrazvočni razbijalec celic z amplitudo 5, vendar smo namesto treh ciklov s 30-sekundnim delovanjem in 15-sekundnim premorom uporabili dva cikla z 10-sekundnim delovanjem in 10-sekundnim premorom (2x10x10). Po končanem razbijanju celic je sledil enak postopek kot opisano zgoraj.

C. Pri tem postopku smo celice lizirali na enak način kot pri metodi B. Po končani lizi celic vzorcem nismo dodali NaCl in mešanice CTAB in NaCl, zato tudi nismo inkubirali pri 65 °C, prav tako smo izpustili korak, v katerem bi dodali kloroform. Takoj po lizi celic smo vzorcem dodali 500 µl mešanice fenol:kloroform:izoamil alkohol v razmerju 25:24:1 (pH 8). Temu je sledil enak postopek, kot je opisan v metodi A.

D. Pri tem postopku smo filtrirane vzorce prenesli v posebne mikrocentrifugirke (kapice s tesnilom in z navoji), ki so vsebovale sterilne cirkonijeve kroglice za lizo celic in celice lizirali s stresanjem (ang. bead beating). Vzorcem smo dodali 0,3 g kroglic s premerom 0,1 mm in 0,1 g kroglic s premerom 0,5 mm. Za lizo celic smo uporabili stresalec Precellys 24, v katerem smo vzorce stresali v treh dimenzijah s hitrostjo 5000 stresljajev v minuti s 30-sekundnim delovanjem in 30-sekundnim premorom. Stresanje smo trikrat ponovili. Po končanem stresanju so se kroglice posedle, supernatant pa smo iz mikrocentrifugirk s kroglicami za lizo celic prenesli v nove (običajne) mikrocentrifugirke, čemur je sledil postopek z dodajanjem 5 M NaCl in sledeči koraki, ki so opisani v metodi A.

E. Mikrobo DNA smo iz vzorcev izolirali tudi po metodi RBB+C (ang. Repeated Bead Beating plus Column method), ki sta jo opisala Yu in Morrison (2004). Za lizo celic smo vzorcem najprej dodali 1 ml pufra za lizo celic (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA in 4 % SDS) in 0,4 g sterilnih cirkonijevih kroglic (0,3 g kroglic s premerom 0,1 mm in 0,1 g kroglic s premerom 0,5 mm) ter jih tri minute stressali s stresalcem Precellys 24 pri hitrosti 5000 stresljajev v minuti. Sledila je 15-minutna inkubacija pri temperaturi 70 °C in nato 5-minutno centrifugiranje pri 4 °C pri 16 000 x g. Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, dodali 300 µl pufra za lizo celic ter znova ponovili postopek (3-minutnega stresanja pri hitrosti 5000 stresljajev v minuti, 15-minutne inkubacije pri 70 °C in 5-minutnega centrifugiranja pri 4 °C pri 16 000 x g). Nato smo supernatant prenesli in razdelili v dve novi mikrocentrifugirki. V vsako smo dodali 260 µl 10 M amonijevega acetata, dobro premešali ter 5 minut inkubirali na ledu. Potem smo 10 minut centrifugirali pri 4 °C pri 16 000 x g. Vsak supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali enak volumen izopropanola, dobro premešali ter 30 minut inkubirali na ledu, centrifugirali (10 min, 4 °C, 16 000 x g), odstranili supernatant, sprali pelet nukleinskih kislin s 70 % etanolom ter ga osušili ob gorilniku. Pelet smo raztopili v 100 µl pufra TE ter dodali 2 µl RNaze (DNase-free, 10 mg/ml) in 15 minut inkubirali pri temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo izolirano DNA shranili pri -20 °C.

F. DNA smo iz vzorcev izolirali tudi s komercialnim kompletom Maxwell 16 Tissue DNA Purification kit po navodilih proizvajalca. Predhodno smo celice lizirali ali z ultrazvočnim razbijalcem celic po postopku, ki je opisan v metodi A (oznaka v tekstu AF) ali s stresalcem Precellys 24 po postopku, ki je opisan v metodi D (oznaka v tekstu DF).

G. Ta postopek vključuje dodajanje proteinaze K in ga uporabljamo, kadar želimo inaktivirati prisotne nukleaze in s tem izboljšati izkoristek izolacije DNA. Vzorcem smo dodali 567 µl pufra TE, 3 µl proteinaze K (18,5 mg/ml) in 30 µl 10 % SDS. Mešanico smo inkubirali 1 uro pri 37 °C. Nato smo vzorce obdelali po postopku, ki je opisan v metodi A.

H. Ta postopek vključuje dodajanje mešanice encimov lizocima in mutanolizina za biokemijsko lizo bakterijskih celic, saj načenjata celične stene po Gramu pozitivnih in negativnih bakterij. Vzorce smo resuspendirali v 400 µl pufra TE in 100 µl mešanice lizocim/mutanolizin, ki je vsebovala 25 U/ml mutanolizina in 25 mg/ml lizocima. Vzorce smo inkubirali 2 uri pri 37 °C. Nato smo vzorce obdelali po postopku, ki je opisan v metodi A.

3.3.5 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

S to tehniko smo iz predhodno izolirane DNA pomnoževali dele ribosomskih genov (16S rDNA). Za pomnoževanje smo uporabili ciklična termostata Supercycler Trinity in MyCycler.

Vgnezdena PCR: Pri vgnezdeni verižni reakciji s polimerazo smo v prvem delu reakcije za pomnoževanje izolirane DNA uporabljali pare evolucijsko ohranjenih začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R ali FD1 in NadkarniR v končni koncentraciji 0,2 oz. 0,5 µM. Produkte prve reakcije smo uporabili kot tarče v drugi stopnji pomnoževanja, kjer smo uporabili par začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2, katerih vezavna mesta se nahajajo znotraj v prvi stopnji pomnoženega genskega odseka za 16S rRNA. Za pomnoževanje smo uporabili ciklični termostat Supercycler Trinity.

Gradientno PCR smo izvajali na cikličnem termostatu MyCycler. Uporabili smo par začetnih oligonukeotidov HDA1-GC in HDA2 v končni koncentraciji 0,5 µM. Temperatura naleganja začetnih oligonukeotidov je naraščala od 58 °C do 63,4 °C.

Pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo:

Reakcijske mešanice smo pripravili v 200 µl-mikrocentrifugirkah. Končna koncentracija reagentov za posamezno reakcijo pri uporabi različnih parov začetnih oligonukleotidov je prikazana v preglednici 7.

Preglednica 7: Končna koncentracija reagentov za posamezno reakcijo PCR v reakcijski mešanici pri uporabi različnih parov začetnih oligonukleotidov

Reakcijska mešanica	FD1 in 926R	FD1 in NadkarniR	HDA1-GC in HDA2
obeh začetnih oligonukleotidov	0,2 µM	0,5 µM	0,5 µM
MgCl ₂	2 mM	2 mM	1,5 mM
pufer za <i>Taq</i> -polimerazo	1x	1x	1x
dNTP	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
<i>Taq</i> -Polimeraza DNA	1 enota	1 enota	1 enota
matrica	1 µl	1 µl	1 µl
voda brez nukleaz	do končnega volumna 25 µl	do končnega volumna 25 µl	do končnega volumna 25 µl

V preglednicah 8 in 9 so prikazani uporabljeni začetni oligonukleotidi ter protokoli reakcij PCR z izbranim parom začetnih oligonukleotidov.

Preglednica 8: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za pomnoževanje genskih odsekov 16S rDNA

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje začetnega oligonukleotida	Vir
FD1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Weisburg in sod., 1991
926R	5'-CCG TCA ATT CCT TTA AGT TT-3'	Amann in sod., 1995
NadkarniR	5'-GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT-3'	Nadkarni in sod., 2002
HDA1-GC	5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-3'	Walter in sod., 2000
HDA2	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-3'	Walter in sod., 2000

Preglednica 9: Protokoli reakcij PCR s pari začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R, FD1 in NadkarniR ter HDA1-GC in HDA2

Reakcijska mešanica	FD1 in 926R	FD1 in NadkarniR	HDA1-GC in HDA2
Začetna denaturacija	95 °C 5 minut	95 °C 2 minuti	95 °C 2 minuti
Denaturacija	95 °C 30 sekund	95 °C 30 sekund	95 °C 30 sekund
Naleganje začetnih oligonukleotidov	52 °C 30 sekund	52 °C 30 sekund	58 °C 30 sekund
Polimerizacija	72 °C 2 minuti	72 °C 45 sekund	72 °C 40 sekund
Končna polimerizacija	72 °C 7 minut	72 °C 5 minut	72 °C 5 minut
Število ciklov	20	13, 16 ali 19	35
Pričakovana dolžina pomnožka	~900 bp	~800 bp	~200 bp

3.3.6 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverjali uspešnost izolacije bakterijske DNA ter nastanek specifičnih pomnožkov pri verižni reakciji s polimerazo. Pripravili smo gele z 1 % agarozo, ki smo jo raztopili v 0,5x pufru TBE. Na gel smo nanašali po 3-5 µl posameznega vzorca in 0,5-1 µl nalagalnega pufra za agarozni gel. Za oceno velikosti DNA produktov smo na gel nanesli 3 µl velikostnega standarda GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Elektroforeza je v elektroforezni kadi potekala 35 minut v 0,5x pufru TBE pri napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gele 15 minut barvali v raztopini etidijevega bromida koncentracije 1 µg/ml in jih nato razbarvali v destilirani vodi po 30 minutah. DNA na agaroznih gelih smo pregledali pod UV lučjo v transiluminatorju Gel Doc 1000 in jih dokumentirali s programom Molecular Analyst 1.5, ki služi za zajemanje in obdelavo slike.

3.3.7 Poliakrilamidna gelska elektroforeza z gradientom denaturanta (DGGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza z gradientom denaturanta (DGGE) je elektroforezna metoda, ki omogoča elektroforetsko ločevanje enako dolgih odsekov DNA, praviloma pomnožkov reakcije PCR, glede na interno sekvenco preučevane DNA. Uspešno pomnoženi odseki mikrobne DNA na gelu DGGE v prisotnosti naraščajočega denaturanta različno potujejo. Zaradi različnega zaporedja nukleotidov, predvsem prisotnosti oz. odsotnosti regij bogatih z adenini in timini (AT-parov), ki imajo izrazito nizko temperaturo taljenja, se dvojerižna struktura pomnožkov reakcije PCR različno hitro spreminja (odpira), spremenjena konformacija pa vodi v upočasnjeno potovanje in posledično v zaustavitev. Na tak način se pomnožki različnih mikrobnih vrst ločijo na osnovi razlik v zaporedju DNA, v primeru analize kompleksne mikrobiote pa nastane bolj ali manj bogata lestvica lis (pomnožkov), ki tvorijo specifični profil dane mikrobiote.

Pripravili smo gele z 8 % poliakrilamidom, 1x pufom TAE in denaturantom iz 7 M uree in 40 % formamida v gradientu od 30 do 65 %. Pripravljenim raztopinam s 30 % oz. 65 % denaturanta smo dodali 130 µl 10 % amonijevega persulfata ter 8 µl TEMED. Gel smo vlili med stekli in ga pustili polimerizirati 4 ure. Nato smo na gel nanesli mešanice, sestavljene iz 20 µl nanašalnega pufra za DGGE in 20 µl pomnoženih produktov PCR izbranih vzorcev. Za preverjanje gradienta in za primerjavo med geli smo vsakič nanesli tudi 5 µl standarda DGGE, ki je bil sestavljen iz pomnožkov PCR z zanimi elektroforetskimi lastnostmi, da so skupaj tvorili ustrezno lestvico lis na gelu. Standard DGGE je pripravil dr. Luka Lipoglavšek iz Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Biotehniške fakultete. Elektroforeza je v sistemu D GENETM ali v DCODETM potekala 16,5 ur v 1x pufu TAE pri 65 °C, 75 V, 70 mA in 5 W. Po končani elektroforezi smo gel barvali 30 do 60 minut v 1x raztopini barvila SYBR® Safe DNA Gel Stain. Gel smo slikali v UV-transluminatorju ChemiGenious² s programom GeneSnap.

3.3.8 Postopki pridobivanja DNA za sekvcenciranje

Dele poliakrilamidnih gelov, na katerih smo opazili lise po elektroforezi in obsevanju s svetlobo UV, smo s skalpelom izrezali pod UV-lučjo. Izrezan del gela (cca. 14 mm³) smo 2 uri inkubirali v 300 µl vode brez nukleaz pri 4 °C. V takšnih razmerah so v gelu DGGE ujeti pomnožki PCR difundirali v vodo, nato pa smo jih uporabili kot matrico za nadaljnje pomnoževanje z začetnimi oligonukleotidi HDA1-GC in HDA2. Produkte reakcije PCR s 35 cikli smo očistili s komercialnim kompletom High Pure PCR Product Purification Kit in jih poslali na sekvcenciranje v podjetje Microsynth v Švico.

3.3.9 Analiza sekvcenc

Rezultate sekvcenciranja smo prejeli v računalniških formatih .ab1, ki se uporablja za obdelavo sekvcenc z računalniškim programom BioEdit, in .fasta, ki je uporaben pri analizi sekvcenc na spletnih straneh Ribosome Database Project (RDP) (Wang in sod., 2007) in National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Johnson in sod., 2008). Prosto

dostopno orodje Classifier na spletni strani RDP 11.3 omogoča umestitev novih sekvenc v obstoječo bazo podatkov, SeqMatch pa identifikacijo najbolj sorodnih sekvenc iz baze podatkov. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) je orodje na spletni strani NCBI, ki omogoča iskanje podobnih sekvenc v bazah podatkov. Mi smo za iskanje najbolj podobnih sekvenc uporabili algoritem megablast.

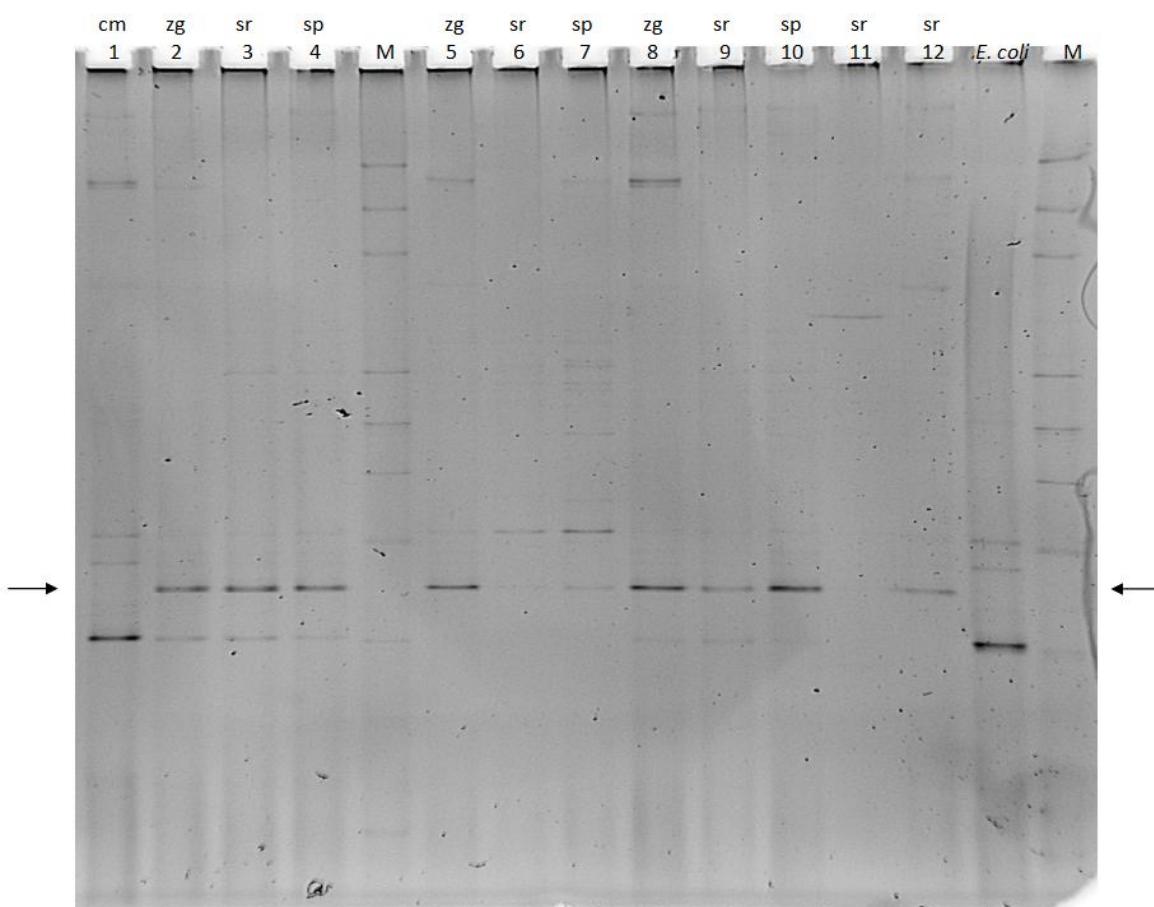
4 REZULTATI

4.1 OPTIMIZACIJA METOD

4.1.1 Začetni poskusi

Skupno mikrobnou DNA smo iz vzorcev vsebine satnih celic nameravali izolirati po postopku, ki je opisan v poglavju 3.3.4 Izolacija bakterijske DNA (metoda A) in vključuje ultrazvočni razbijalec celic in nato fenol-kloroformno ekstrakcijo DNA. To je postopek, ki ga na Katedri za mikrobiologijo in mikrobnou biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete rutinsko uporabljajo za izolacijo mikrobnou DNA iz naravnih vzorcev. Uporabili smo testne vzorce vsebine satnic celic, ki so jih pripravili na Oddelku za biologijo (opisano v poglavju 3.2.1 Vzorci). Ko smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili uspešnost izolacije DNA, smo ugotovili, da je koncentracija izolirane DNA izredno nizka (ni prikazano). Kljub temu smo izvedli še pomnoževanje genskega odseka za 16S rRNA z verižno reakcijo s polimerazo, v kateri smo uporabili začetna oligonukleotida HDA1-GC in HDA2. Izbrali smo večje število ciklov kot običajno (35x), da bi zagotovili nastanek pomnožkov PCR kljub domnevno nižji koncentraciji tarčne DNA. Z negativno kontrolo, v kateri smo namesto tarčne DNA v reakcijsko mešanico dodali vodo, smo preverjali možni nastanek naključnih pomnožkov zaradi velikega števila ciklov in dejstva, da predvsem v poznih ciklih med izvedbo reakcije pogosto prihaja do napak (npr. pri delovanju polimeraze). Uspešnost verižne reakcije s polimerazo smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (ni prikazano). Pomnožene produkte verižne reakcije smo nato analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z gradientom denaturanta (DGGE). Rezultati so prikazani na sliki 7.

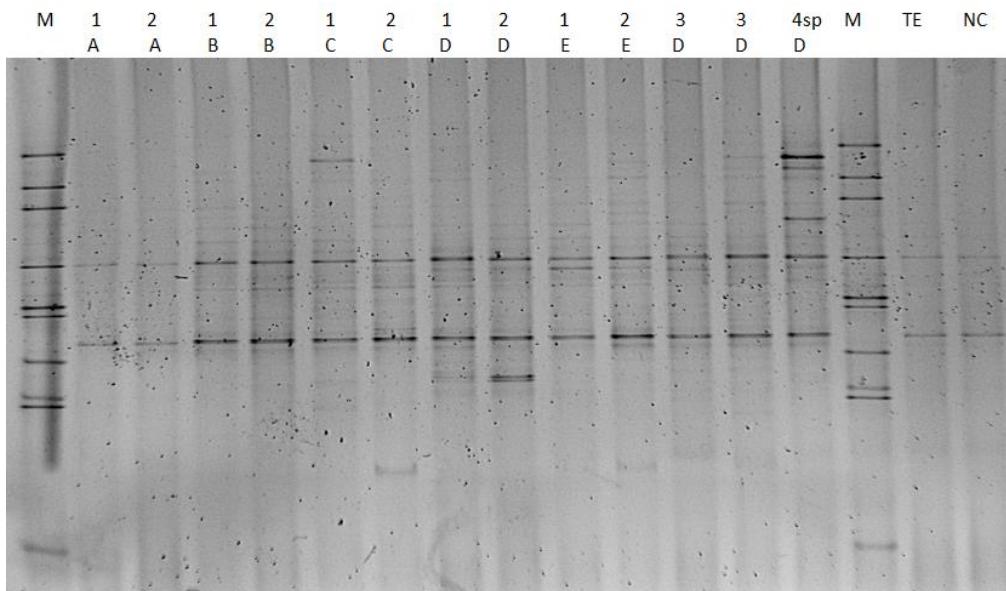
Na sliki gela DGGE je pri vseh vzorcih opazen profil z majhnim številom lis. Poleg tega se je v skoraj vseh vzorcih, razen pri vzorcu 'cm' (med nad čebeljim kruhkom), na istem mestu pojavila močnejša lisa (na sliki 7 označeno s puščicama). To po izkušnjah sodeč običajno pomeni, da gre za artefakt (Neilson in sod., 2013), torej opažanje oz. rezultat, ki je posledica metodoloških postopkov in v danem primeru ne predstavlja pomnožka dejanske DNA v vzorcu.



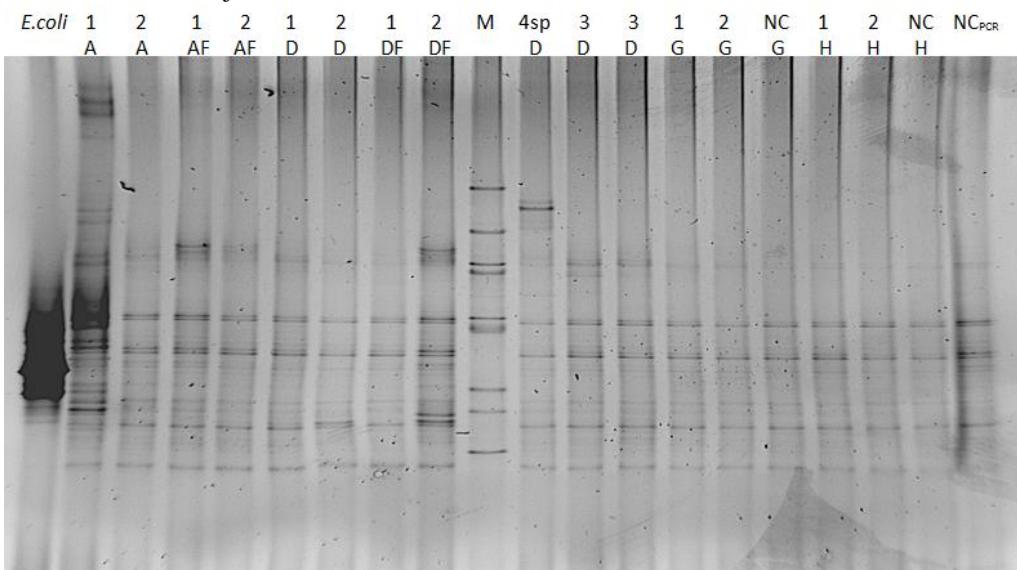
Slika 7: Gelska elektroforeza DGGE pomnoženih genskih odsekov za mikrobnno 16S rRNA iz testnih vzorcev za začetno analizo. Zaporedna številka označuje satno celico, iz katere je bil vzeti vzorec čebeljega kruhka, oznake 'sp', 'sr', in 'zg' označujejo spodnjo, srednjo in zgornjo tretjino vsebine satne celice. Oznaka 'cm' označuje vzorec medu nad cvetnim prahom. Črka 'M' označuje standard DGGE. S puščicama je označeno pojavljanje lise v isti liniji pri večini vzorcev.

4.1.2 Uporaba različnih metod izolacije DNA

Postopek izolacije skupne mikrobne DNA smo poskusili optimizirati zato, ker smo na podlagi dobljenih rezultatov domnevali, da je koncentracija izolirane DNA zelo nizka in je zaradi povečanega števila ciklov v reakciji PCR prišlo do nastanka naključnih pomnožkov. Z optimizirano izolacijo smo želeli pridobiti večjo količino DNA ter odpraviti naključne pomnožke v reakciji PCR. Postopki optimizacije izolacije DNA so opisani v poglavju 3.3.4 Izolacija bakterijske DNA in smo jih izvajali na treh vzorcih, ki smo jih pripravili sami (na slikah 8 in 9 označeni z 1, 2 in 3). Tako smo zagotovili homogenost in medsebojno primerljivost vzorcev. Analizirali smo tudi testni vzorec, ki so ga pripravili na Oddelku za biologijo (slike 8 in 9, oznaka 4sp). Za kontrolo smo ponovno izolirali DNA po osnovnem protokolu (A), preizkusili nekaj modifikacij osnovnega protokola (B, C in D), vključili encimsko lizo celic (G, H) ter poskusili z dvema povsem drugačnima pristopoma (E, F). Pomnoževanje DNA smo izvedli z reakcijo PCR s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2 (35 ciklov) in nato izvedli analizo DGGE. Rezultati so prikazani na slikah 8 in 9.



Slika 8: Gelska elektroforeza DGGE testnih vzorcev (1, 2, 3 in 4sp), iz katerih smo izolirali DNA po metodah A, B, C, D in E. Črka 'M' označuje standard DGGE, 'TE' je negativna kontrola izolacije DNA, 'NC' pa negativna kontrola reakcije PCR.

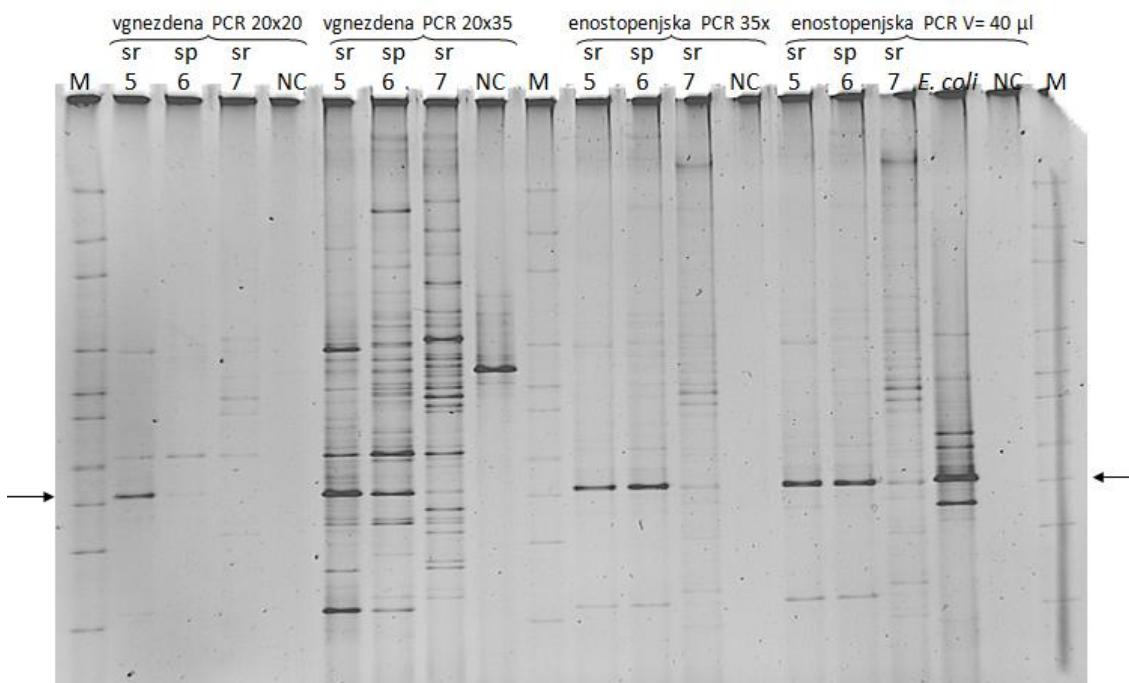


Slika 9: Gelska elektroforeza DGGE testnih vzorcev (1, 2, 3 in 4sp), iz katerih smo izolirali DNA po metodah A, D, F, G in H. Kombinacija črk 'AF' oz. 'DF' pomeni, da smo lizo celic izvedli z ultrazvočnim razbijalcem oz. s krogličnim stresalcem in nadalje izolirali DNA s komercialnim kompletom Maxwell. Črka 'M' označuje standard DGGE, 'NC' negativni kontroli izolacije DNA ter negativno kontrolo reakcije PCR.

Čeprav se na prvi pogled zdi, da smo pridobili močnejše in številčnejše lise na profilih gelov DGGE, lahko znova opazimo pojavljanje lis v isti liniji in tudi nastajanje pomnožkov pri negativnih kontrolah. Če na profilih ne upoštevamo lis, ki se na istih mestih pojavitajo tudi pri negativnih kontrolah, ugotovimo, da prav noben izmed teh različnih postopkov izolacije DNA ni omogočil nastanka bogatejšega profila DGGE, ki bi vseboval močnejše in številčnejše lise. Ker pa smo tudi pri negativnih kontrolah opazili nastajanje nespecifičnih pomnožkov, smo sklepali, da uporabljeni pristop k problemu ni pravi in da moramo uporabljene postopke izboljšati.

4.1.3 Vgnezdena verižna reakcija s polimerazo

Da bi omogočili nastanek bogatejših in močnejših profilov pomnožkov reakcije PCR na gelu DGGE, smo poskusili povečati učinkovitost pomnoževanja z metodo vgnezdenje verižne reakcije s polimerazo (ang. nested PCR). To smo storili tako, da smo v prvi stopnji uporabili par začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R, v drugi stopnji pa par HDA1-GC in HDA2, ki nalega znotraj produkta prve reakcije. Prva stopnja je vsebovala 20, druga pa 20 ali 35 ciklov. Učinkovitost pomnoževanja smo primerjali z učinkovitostjo enostopenjske reakcije PCR s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2 (35 ciklov), preverili pa smo tudi, ali se učinkovitost enostopenjske PCR izboljša, če povečamo reakcijski volumen (namesto 25 µl smo pripravili reakcijsko mešanico v 40 µl). Uporabili smo po metodi A izolirano DNA treh testnih vzorcev, ki smo jih dobili z Oddelka za biologijo. Rezultati so prikazani na sliki 10.

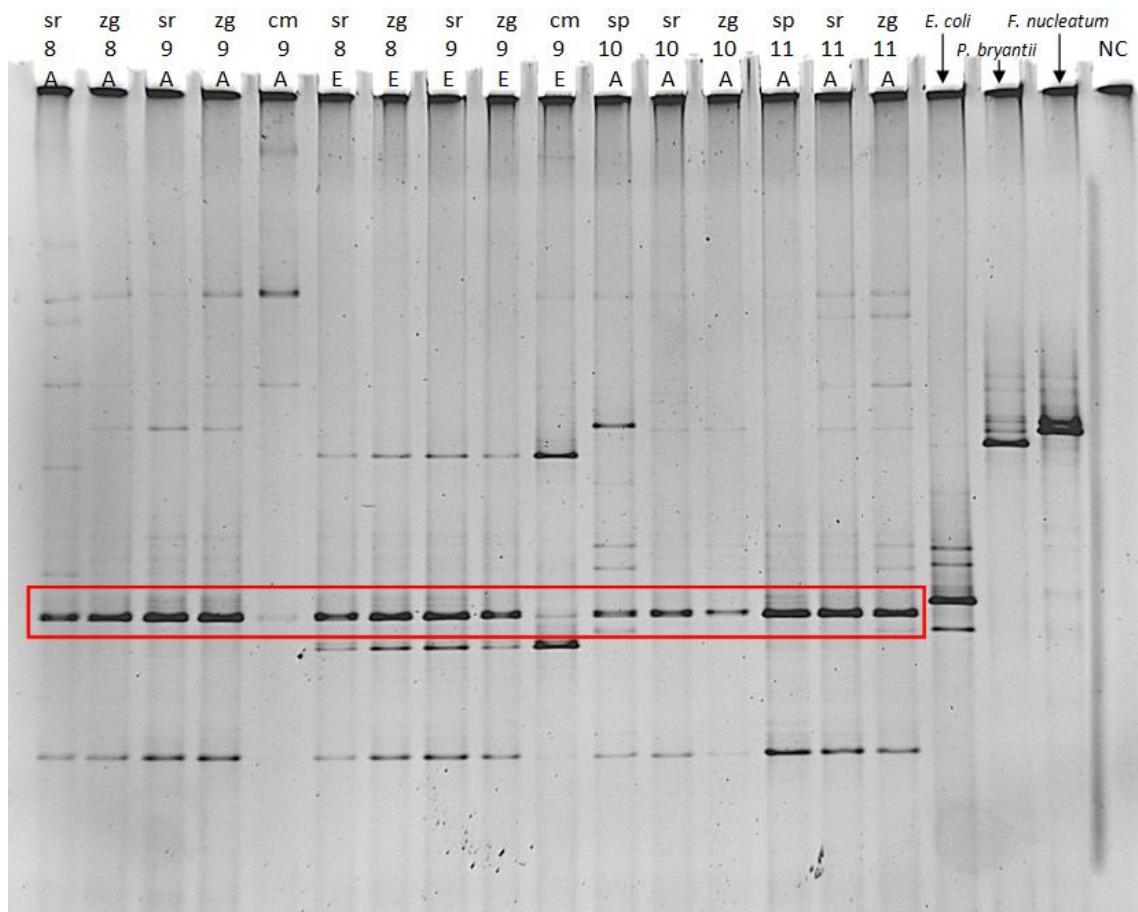


Slika 10: Gelska elektroforeza DGGE testnih vzorcev (5sr, 6sp in 7sr) z vgnezdeno PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA v primerjavi z enostopenjsko PCR. Nad vzorci je označen tip reakcije PCR in število ciklov, 'NC' označuje negativno kontrolo, za pozitivno kontrolo smo uporabili DNA pridobljeno iz čiste kulture *E. coli*. Puščici na obeh straneh gela kažeta pojavljanje lise v isti liniji.

Poskus je pokazal, da je vgnezdena PCR s kombinacijo ciklov 20x35 omogočila nastanek bogatejših profilov na gelu DGGE. Izkazalo pa se je tudi, da je ponovljivost metode zelo slaba, saj enakih profilov iz teh vzorcev nismo več uspeli pridobiti (ni prikazano). Poleg tega so nastali tudi nespecifični produkti verižne reakcije pri negativni kontroli. V enostopenjski PCR so pričakovano nastali šibkejši produkti, zato so bili tudi profili lis na gelu DGGE šibkejši. Razlik med vzorci, pri katerih je PCR potekala v 25 µl reakcijskega volumna in tistih, pri katerih je PCR potekala v 40 µl reakcijskega volumna, nismo opazili. Še vedno pa smo lahko opazili pojavljanje lis v isti liniji, kar je na sliki označeno s puščicama.

4.1.4 Analiza prisotnosti rastlinske DNA v preučevanih vzorcih

Iz slik gelov DGGE (slike 7, 8, 9 in 10) je razvidno, da so se pri večini vzorcev pojavljale lise v isti liniji ne glede na metodo izolacije DNA ali protokol reakcije PCR (na slikah 7 in 10 označeno s puščicami). Da bi ugotovili, zakaj se to dogaja, smo naredili nov gel DGGE (slika 11), na katerem smo primerjali testne vzorce, ki so jih pripravili na Oddelku za biologijo in smo iz njih izolirali DNA po metodah A oz. E. DNA smo pomnožili v reakciji PCR s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2.



Slika 11: Gelska elektroforeza DGGE v enostopenjski PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA testnih vzorcev (8, 9, 10 in 11). Oznake 'zg', 'sr', in 'sp' označujejo spodnjo, srednjo in zgornjo tretjino vsebine satne celice, oznaka 'cm' pa vzorec medu nad cvetnim prahom. Črki A in E označujeta metodo izolacije DNA, 'NC' negativno kontrola reakcije PCR. DNA bakterij *E. coli*, *P. bryantii* in *F. nucleatum* predstavljajo pozitivne kontrole reakcije PCR. Rdeči pravokotnik označuje pojavljanje rastlinske DNA v vzorcih.

Slike je razvidno pojavljanje najmočnejše elektroforetske lise v profilu čebeljega kruhka pri vseh preučevanih vzorcih na istem mestu. V isti liniji se je lisa pojavila tudi pri vzorcih medu, ki je bil vzet nad cvetnim prahom, vendar lisa v tem primeru ni tako izrazita. Lise na istem mestu so označene z rdečim pravokotnikom.

Odločili smo se, da bomo iz izolirane DNA enega od vzorcev (8zgA) poskusili neposredno pomnožiti ribosomske gene za 16S rRNA s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R, pomnožek sekvencirali in tako ugotovili ali je v omenjeni lisi dejansko prisoten pomnožek nekega bakterijskega odseka DNA ali gre morda za artefakt. Upali smo, da je prebitek DNA v najmočnejšem pomnožku tega vzorca tako velik, da šum drugih sekvenc pri neposrednem sekvenciranju ne bo motil in bo pridobljena sekvenca dovolj kvalitetna za nadaljnje analize. Produkt reakcije PCR smo očistili s komercialnim kompletom High Pure PCR Product Purification Kit ter ga skupaj z začetnim oligonukleotidom FD1 poslali na sekvenciranje v podjetje Microsynth v Švico, kjer so izvedli metodo sekvenciranja z dideoksinukleotidi po Sangerju s kapilarno elektroforezo.

Poslali so nam sekvenco:

5'-GCT GAG GAG CAA AAG GAG GAA TCC GCC TGA GGA GGG GCT CGC GTC TGA TTA GCT AGT TGG TGA GGC WRT AGC TTA CCA AGG CGA TGA TCA GTA GCT GGT TCG AGA GGA TGA TCA GCC ACA CTG GNA CTG ANN CAC GGC CCN NAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG KGG GGA ATT TTC CGC AAT GGG CGA AAG CCT GAC GGA GCA ATG CCG CGT GGA GGT AGA AGG CCT ACG GGT CGT GAA CTT CTT TTC CCG GAG AAG AAG CAA TGA CGG TAT CTG GGG AAT AAG CAT CGG CTA ACT CTG TGC CAG CAG CCG CGG TAA TAC AGA GGA TGC AAG CGT TAT CCG GAA TGA TTG GGC GTA AAG CGT CTG TAG GTG GCT TTT TAA GTC CGC CGT CAA ATC CCA GGG CTC AAC CCT GGA CAG GCG GTG GAA ACT ACC AAG CTG GAG TAC GGT AGG GGC AGA GGG AAT TTC CGG TGG AGC GGT GAA ATG CGT AGA GAT CGR AAA GAA CAC CAA CGG CGA AAG CAC TCT GCT GGG CCG ACA CTG ACA CTG AGA GAC GAA AGC TAG GGK AGC GAA TGG GAT TAG ATA CCC CAG TAG TCC TAG CCG TAA ACG ATG GAT ACT AGG CGC TGT GCG TAT CGA CCC GTG CAG TGC TRT AGC TAA CGC GTT AAG TAT CCC GCC TGG GGA GTA CGT TCG CAA GAA TGA-3'

Taksonomsko identiteto organizma, iz katerega izhaja pridobljena sekvenca, smo ugotavljali z orodji Classifier (slika 12) in SeqMatch (slika 14 zgoraj) na spletni strani RDP ter z algoritmom megablast na spletni strani NCBI (slika 15 zgoraj).

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.10, October 2014
Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 10 with 16S gene copy number from rrnDBv4.2.2
Query File: classifier_seq_upload7688078025937043175.fasta
Query Submit Date: Wed Mar 11 05:19:56 EDT 2015

Display depth: Auto	Confidence threshold: 80%	CopyNumber Adjusted: No	<input type="button" value="Refresh"/>
		Library	
domain	%		
Bacteria	100.0		

Hierarchy View (click a node to make it the root -- only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

- rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only]
- » domain Bacteria (1)
- » » phylum Cyanobacteria/Chloroplast (1)
- » » » class Chloroplast (1)
- » » » » family Chloroplast (1)
- » » » » genus Streptophyta (1)

Assignment Detail (for Streptophyta with Confidence threshold: 80%):

classifier_seq Root[100%] Bacteria[100%] Cyanobacteria/Chloroplast[100%] Chloroplast[100%] Streptophyta[100%]

Slika 12: Rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence z orodjem RDP Classifier.

Na osnovi opravljene primerjalne analize smo ugotovili, da smo dejansko izolirali in pomnoževali kloroplastno DNA. Da bi dokazali in potrdili, da lise, ki so se po DGGE elektroforezi ustavile na enakem mestu kot zgoraj omenjena lisa, dejansko vsebujejo pomnožke ribosomskih genov iz kloroplastne DNA, smo v nadaljevanju izbrali še nekaj vzorcev (9zgA in 9srE) in iz gela DGGE izrezali tiste dele, na katerih smo pod UV-lučjo opazili omenjene lise. Izrezane dele gela smo dve uri inkubirali v sterilni vodi brez nukleaz, da smo iz poliakrilamidnega gela sprostili produkte reakcije PCR. Sproščeno DNA smo uporabili za matrico reakcije PCR z začetnimi oligonukleotidi HDA1-GC in HDA2 in produkte ponovno pomnožili v 15, 20 ali 35 ciklih. Produkte reakcije PCR smo očistili s komercialnim kompletom High Pure PCR Product Purification Kit ter jih poslali na sekvenciranje v podjetje Microsynth v Švico, kjer so izvedli metodo sekvenciranja z dideoksinukleotidi po Sangerju s kapilarno elektroforezo. Uporabili so sekvencijski začetni oligonukleotid HDA1-GC, ki smo ga poslali skupaj z vzorci.

Sekvenci, ki smo ju prejeli od podjetja Microsynth, sta bili enaki:

5'-TTG CTT CTT CTC CGG GAA AAG AAG TTC ACG ACC CGT AGG CCT TCT ACC TCC
ACG CGG CAT TGC TCC GTC AGG CTT TCG CCC ATT GCG GAA AAT TCC CCA-3'

Sekvenco smo pregledali v programu BioEdit v obliki elektroferograma (.ab1) ter odstranili začetni oz. končni del sekvence, v katerem so vrhovi kromatografa bili nizki, dvojni ali medsebojno prekrivajoči. Taksonomsko identiteto organizma, iz katerega izhaja pridobljena sekvencia, smo ugotavljali z orodji Classifier (slika 13) in SeqMatch (slika 14 spodaj) na spletni strani RDP ter z algoritmom megablast na spletni strani NCBI (slika 15 spodaj).

Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.10, October 2014
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 10 with 16S gene copy number from rrnDBv4.2.2
 Query File: classifier_seq_upload9027706762788737834.fasta
 Query Submit Date: Wed Feb 11 09:58:05 EST 2015

Display depth: Auto Confidence threshold: 80% CopyNumber Adjusted: No Refresh

domain	%	Library
Bacteria	100.0	

Hierarchy View (click a node to make it the root - only show sequences assigned to that node with confidence above the threshold):

```

rootrank Root (1 sequences) [show assignment detail for Root only] download entire hierarchy as text file
  » » domain Bacteria (1)
  » » » phylum Cyanobacteria/Chloroplast (1)
  » » » » class Chloroplast (1)
  » » » » » family Chloroplast (1)
  » » » » » » genus Streptophyta (1)

```

Assignment Detail (for Root with Confidence threshold: 80%):

classifier_seq - Root[100%] Bacteria[100%] Cyanobacteria/Chloroplast[100%] Chloroplast[100%] Streptophyta[100%]

Slika 13: Rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz gela DGGE z orodjem RDP Classifier.

+ rootrank Root (0/20/1444049) (selected/match/total RDP sequences)
+ domain Bacteria (0/20/1408156)
+ phylum Cyanobacteria/Chloroplast (0/20/24493)
+ class Chloroplast (0/20/6496)
+ family Chloroplast (0/20/6496)
+ genus Streptophyta (0/20/2254)
□ S000731813 not_calculated 1.000 1365 uncultured bacterium; JSC9-B; DQ532258
□ S000828198 not_calculated 1.000 1265 uncultured actinobacterium; 3G1820-35; DQ431885
□ S000828202 not_calculated 1.000 1265 uncultured cyanobacterium; 3B1820-43; DQ431889
□ S001477200 not_calculated 1.000 1231 uncultured eukaryote; nbu496b02c1; GQ051136
□ S001502206 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw361b11c1; GQ076142
□ S001510043 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw256e06c1; GQ083979
□ S001534372 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw605a12c1; GQ108308
□ S001534382 not_calculated 1.000 1231 uncultured eukaryote; nbw605c01c1; GQ108318
□ S001534387 not_calculated 1.000 1228 uncultured eukaryote; nbw605c07c1; GQ108323
□ S001534392 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw605c12c1; GQ108328
□ S001534407 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw605e03c1; GQ108343
□ S001534422 not_calculated 1.000 1231 uncultured eukaryote; nbw605f09c1; GQ108358
□ S001534428 not_calculated 1.000 1228 uncultured eukaryote; nbw605g03c1; GQ108364
□ S001534430 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw605g05c1; GQ108366
□ S001534451 not_calculated 1.000 1229 uncultured eukaryote; nbw606a08c1; GQ108387
□ S001534453 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw606a10c1; GQ108389
□ S001534454 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw606a11c1; GQ108390
□ S001534456 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw606b02c1; GQ108392
□ S001534462 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw606b08c1; GQ108398
□ S001534463 not_calculated 1.000 1230 uncultured eukaryote; nbw606b09c1; GQ108399
+ rootrank Root (0/20/1444049) (selected/match/total RDP sequences)
+ domain Bacteria (0/20/1408156)
+ phylum Cyanobacteria/Chloroplast (0/20/24493)
+ class Chloroplast (0/20/6496)
+ family Chloroplast (0/20/6496)
+ genus Streptophyta (0/20/2254)
□ S000531305 - not_calculated 1.000 1397 Cucumis sativus (T); AJ970307
□ S000531308 - not_calculated 1.000 1399 Cucumis sativus (T); AJ970307
□ S000586575 - not_calculated 1.000 1358 uncultured bacterium; AKIW415; DQ129642
□ S000586576 - not_calculated 1.000 1358 uncultured bacterium; AKIW940; DQ129643
□ S000586577 - not_calculated 1.000 1360 uncultured bacterium; AKIW961; DQ129644
□ S000633718 - not_calculated 1.000 1397 Cucumis sativus; DQ119058
□ S000633721 - not_calculated 1.000 1397 Cucumis sativus; DQ119058
□ S000641549 - not_calculated 1.000 1348 Trewia nudiflora; DQ000201
□ S000641743 - not_calculated 1.000 1338 Ricinus communis; L37580
□ S000731812 - not_calculated 1.000 1370 uncultured bacterium; JSC9-J; DQ532257
□ S000731813 - not_calculated 1.000 1365 uncultured bacterium; JSC9-B; DQ532258
□ S000731875 - not_calculated 1.000 1360 uncultured bacterium; KSC4-53; DQ532320
□ S000787005 - not_calculated 1.000 1266 uncultured bacterium; RL387_aao89h04; DQ800954
□ S000828198 - not_calculated 1.000 1265 uncultured actinobacterium; 3G1820-35; DQ431885
□ S000828202 - not_calculated 1.000 1265 uncultured cyanobacterium; 3B1820-43; DQ431889
□ S000949057 - not_calculated 1.000 1184 uncultured bacterium; ARDRA0157; EF050118
□ S000976733 - not_calculated 1.000 1349 uncultured Oscillatoria sp.; AV_4S-E05; EU341154
□ S000976871 - not_calculated 1.000 1350 uncultured Oscillatoria sp.; AV_8R-S-F09; EU341292
□ S001020451 - not_calculated 1.000 1397 Morus indica (T); DQ226511
□ S001020454 - not_calculated 1.000 1397 Morus indica (T); DQ226511

Slika 14: Rezultati poizvedbe SeqMatch z daljšo sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R (zgoraj) ter krajsko sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2 (spodaj).

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Quercus aquifolioides chloroplast, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	KP340971.1
Quercus spinosa chloroplast, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	KM841421.1
Quercus aliena chloroplast, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	KP301144.1
Lithocarpus balansae plastid, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	KP299291.1
Uncultured bacterium clone ncd2654c02c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		1234	1234	100%	0.0	98%	KF101371.1
Trigonobalanus doichangensis chloroplast, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	KF990556.1
Castanopsis echinocarpa chloroplast, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	KJ001129.1
Quercus rubra plastid, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	JX970937.1
Quercus nigra ribosomal protein L2 (rpl2) and ribosomal protein L23 (rpl23) genes, complete genome		1234	1234	100%	0.0	98%	HQ664601.1
Castanea mollissima chloroplast, complete genome		1234	2469	100%	0.0	98%	HQ336406.1
Uncultured eukaryote clone ncd420q04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM323999.1
Uncultured eukaryote clone ncd313d10c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM316898.1
Uncultured eukaryote clone ncd312q05c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM316889.1
Uncultured eukaryote clone ncd312e04c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM316843.1
Uncultured eukaryote clone ncd312a01c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM316810.1
Uncultured eukaryote clone ncd311c01c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM316766.1
Uncultured eukaryote clone ncd310h03c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM316749.1
Uncultured eukaryote clone ncd310e11c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; plastid		1234	1234	100%	0.0	98%	HM316730.1

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Quercus aquifolioides chloroplast, complete genome		183	367	100%	3e-43	100%	KP340971.1
Quercus spinosa chloroplast, complete genome		183	367	100%	3e-43	100%	KM841421.1
Morus mongolica chloroplast, complete genome		183	367	100%	3e-43	100%	KM491711.2
Quercus aliena chloroplast, complete genome		183	367	100%	3e-43	100%	KP301144.1
Tamarindus indica chloroplast, complete genome		183	367	100%	3e-43	100%	KJ468103.1
Arachis hypogaea chloroplast, complete genome		183	367	100%	3e-43	100%	KJ468094.1
Lithocarpus balansae plastid, complete genome		183	367	100%	3e-43	100%	KP299291.1
Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14S-279 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		183	183	100%	3e-43	100%	KM873113.1
Uncultured Trichodesmium sp. clone ACH-14L-298 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		183	183	100%	3e-43	100%	KM873059.1
Cucumis melo genomic scaffold_unassembled_sequence32336		183	183	100%	3e-43	100%	LN684765.1
Uncultured bacterium isolate DGGE gel band Y_26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		183	183	100%	3e-43	100%	KM411597.1
Uncultured bacterium isolate DGGE gel band Y_13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		183	183	100%	3e-43	100%	KM411584.1
Uncultured bacterium isolate DGGE gel band Y_10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence		183	183	100%	3e-43	100%	KM411581.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA_1.852_N9D0_16S_A		183	183	100%	3e-43	100%	LN568861.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA_1.971_N9D0_16S_A		183	183	100%	3e-43	100%	LN568860.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA_1.1341_N9D0_16S_A		183	183	100%	3e-43	100%	LN568859.1
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SIHA_1.1122_N9D0_16S_A		183	183	100%	3e-43	100%	LN568858.1
Uncultured eukaryote chloroplast gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, clone: KZtp4-9		183	183	100%	3e-43	100%	AB900948.1

Slika 15: Rezultati poizvedbe z orodjem megablast z daljšo sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R (zgoraj) ter kraješo sekvenco, ki smo jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2 (spodaj).

Rezultat analize obeh sekvenc je pokazal, da smo iz vzorcev izolirali rastlinsko kloroplastno DNA ter jo z uporabljenim protokolom PCR in začetnimi oligonukleotidi uspešno pomnožili. Najbolj pogosto se je pojavil zadetek 'Uncultured eukaryote' ali 'Uncultured bacterium'. Ko smo zadetke podrobneje preučili, smo ugotovili, da čeprav nekateri zadetki nakazujejo na sekvence bakterijskega izvora, ti zadetki v resnici prav tako predstavljajo sekvence, ki izhajajo iz kloroplastne DNA različnih rastlinskih vrst. Lahko torej trdimo, da pomnožek kloroplastne DNA predstavlja najmočnejšo liso v profilih DGGE v vseh preučenih vzorcih čebeljega kruhka, ne pa tudi pri vzorcih medu nad čebeljim kruhkom.

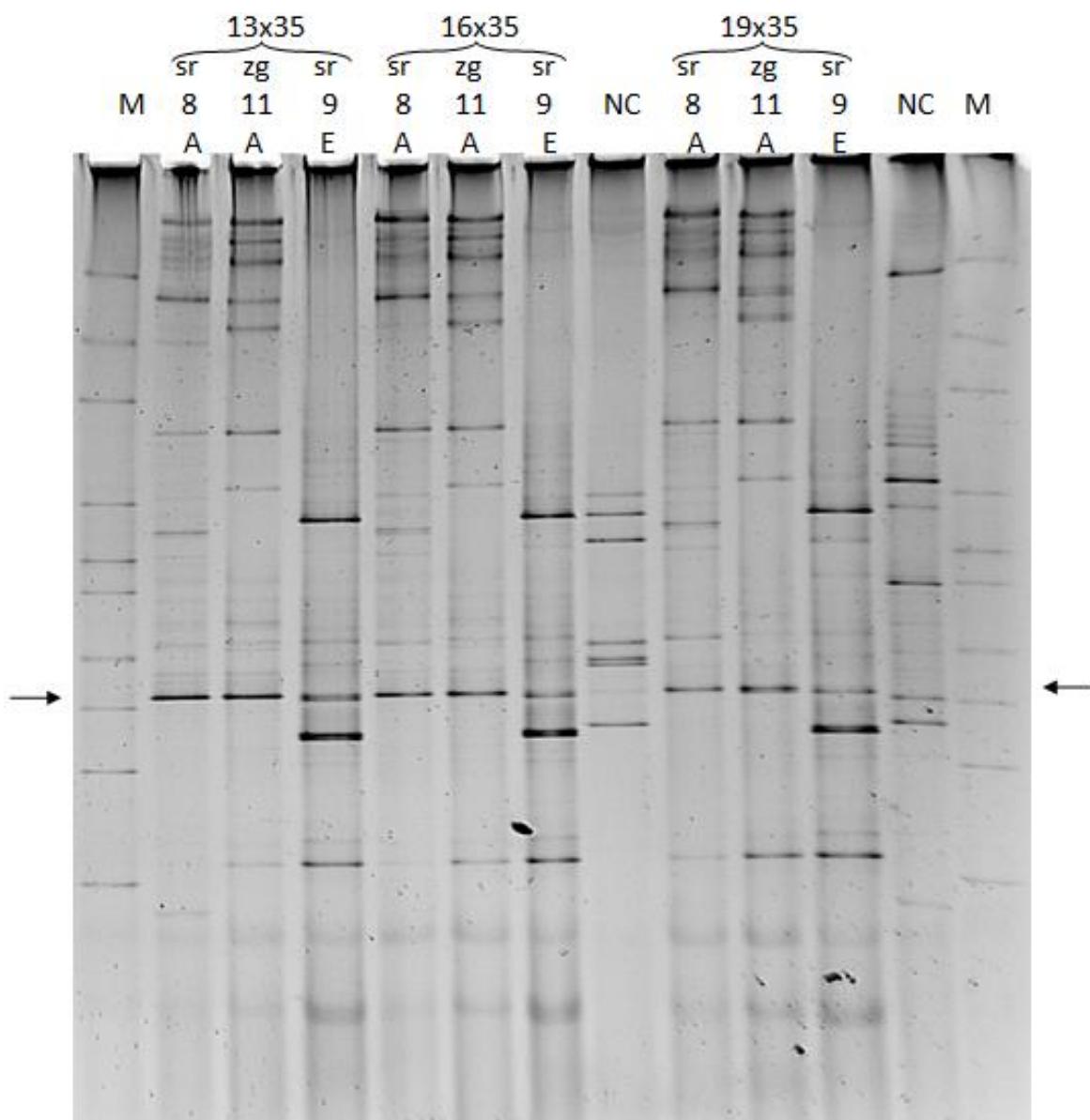
4.1.5 Preprečevanje pomnoževanja rastlinske DNA

V nadaljevanju smo žeeli preprečiti pomnoževanje kloroplastne DNA. Izvedli smo vgnezdeno reakcijo PCR, v kateri smo v prvi stopnji namesto oligonukleotida 926R uporabili drug evolucijsko ohranjeni začetni oligonukleotid, t. i. 'Nadkarni Reverse primer' (Nadkarni in sod., 2002). Sekvenca novo uporabljenega začetnega oligonukleotida je reverzni komplement sekvence začetnega oligonukleotida, ki je v literaturi opisan kot 'anti-chloroplast primer' (Chelius in Triplett, 2001; Redford in sod., 2010; Shade in sod., 2013).

Chelius F: 5'-AAC MGG ATT AGA TAC CCK G-3'

Nadkarni R: 5'-GGA CTA CCA **GGG TAT CTA ATC CTG TT**-3'

Protokol vgnezdenje reakcije PCR je opisan v poglavju 3.3.5 Verižna reakcija s polimerazo (PCR). V prvi stopnji smo izvedli 13, 16 ali 19 ciklov s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in NadkarniR, v drugi stopnji pa 35 ciklov s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2. V tem poskusu smo istočasno preverili tudi vpliv števila ciklov prve stopnje reakcije PCR na učinkovitost pomnoževanja. Uporabili smo tri vzorce, ki so jih pripravili na Oddelku za biologijo. DNA iz teh vzorcev smo izolirali po metodi A (8sr, 11zg) oz. E (9sr). Rezultati so prikazani na sliki 16.

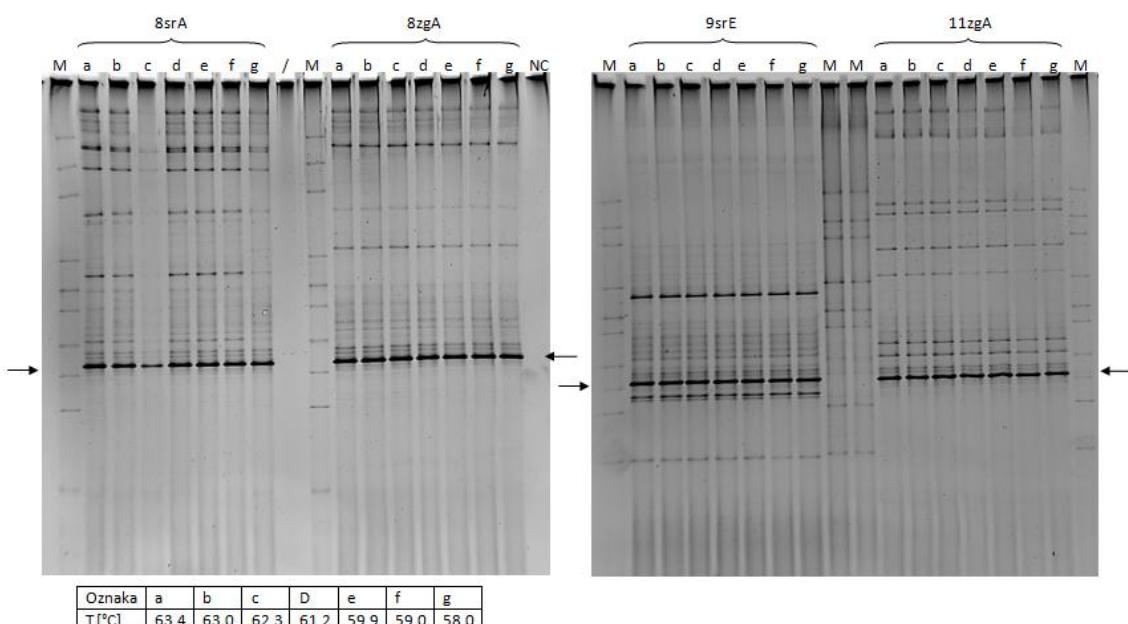


Slika 16: Gelska elektroforeza DGGE z vgnezdeno reakcijo PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA. V prvi stopnji smo uporabili par začetnih oligonukleotidov FD1 in NadkarniR, v drugi stopnji pa HDA1-GC in HDA2. Naredili smo poskus na treh vzorcih (8srA, 11zgA in 9srE) v kombinacijah, kjer smo v prvi stopnji uporabili različno število ciklov (13, 16 in 19). Črka 'M' označuje standard DGGE, 'NC' pa negativno kontrolo. Lise s pomnožki iz rastlinske DNA so označene s puščicama ob strani gela.

Ugotovili smo, da z opisanim postopkom nismo uspeli preprečiti pomnoževanja kloroplastne DNA, čeprav so bile lise, značilne za kloroplastno rDNA, nekaj šibkejše v primerjavi z lisami iz predhodnih poskusov. Profili lis iz posameznih vzorcev, ki smo jih pomnoževali v protokolih z različnim številom ciklov v prvi stopnji (13, 16 oz. 19), se niso bistveno razlikovali. Znova so nastajali nespecifični pomnožki pri negativnih kontrolah.

4.1.6 Gradientna verižna reakcija s polimerazo

Eden od možnih vzrokov pomnoževanja kloroplastne DNA je nizka stopnja strogosti, pri kateri poteka pomnoževanje v verižni reakciji s polimerazo. Pri pomnoževanju z evolucijsko ohranjenimi začetnimi oligonukleotidi je ta stopnja namenoma nizka, zato da v reakciji omogočimo tudi pomnoževanje sekvenc ribosomskih genov iz evolucijsko oddaljenih bakterij, ki imajo v sekvenkah, kamor nalegajo začetni oligonukleotidi, fiksiranih tudi nekaj mutacij. To običajno dosežemo z relativno nizko temperaturo, pri kateri začetni oligonukleotidi prilegajo na tarčno DNA, v našem primeru 58 °C. V takšnem protokolu pa omogočimo tudi pomnoževanje netarčne, npr. kloroplastne DNA. Pomnoževanje kloroplastne DNA smo želeli preprečiti z optimizacijo enostopenjske reakcije PCR s spremjanjem temperature naleganja začetnih oligonukleotidov, s t. i. gradientno reakcijo PCR. Uporabili smo vzorce, ki so jih pripravili na Oddelku za biologijo in smo iz njih izolirali DNA po metodah A (8sr, 8zg in 11zg) oz. E (9sr). Protokol je obsegal 35 ciklov z začetnimi oligonukleotidi HDA1-GC in HDA2, temperature naleganja smo spremenjali od 58 do 63,4 °C. Rezultati so prikazani na sliki 17.

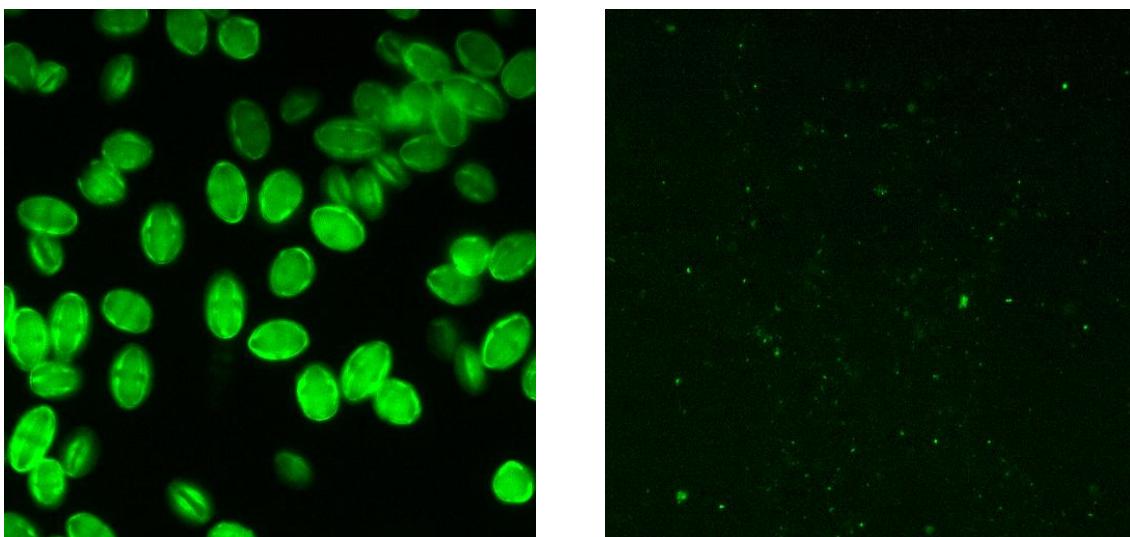


Slika 17: Gelski elektroforezi gelov DGGE z gradientno reakcijo PCR pomnoženih genskih odsekov za 16S rRNA, katere protokol je obsegal 35 ciklov s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2. Naredili smo poskus na štirih vzorcih (8srA, 8zgA, 9srE in 11zgA). Črke a, b, c, d, e, f in g označujejo različne temperature, pri katerih je potekalo naleganje začetnih oligonukleotidov, črka 'M' označuje DGGE standard, 'NC' negativno kontrolo reakcije PCR, oznaka '/' ne vsebuje vzorca. Kloroplastna DNA se domnevno nahaja malce nad osmo liso DGGE standarda, kar je označeno s puščicami ob robu gelov. Ker pri vlivanju gelov ne moremo zagotoviti popolnoma enake razporeditve denaturanta v obeh gelih, DNA posledično potuje različno hitro, kar vodi do zamaknitve v profilih.

Ugotovili smo, da temperatura naleganja začetnih oligonukleotidov ni vplivala na učinkovitost pomnoževanja kloroplastne DNA.

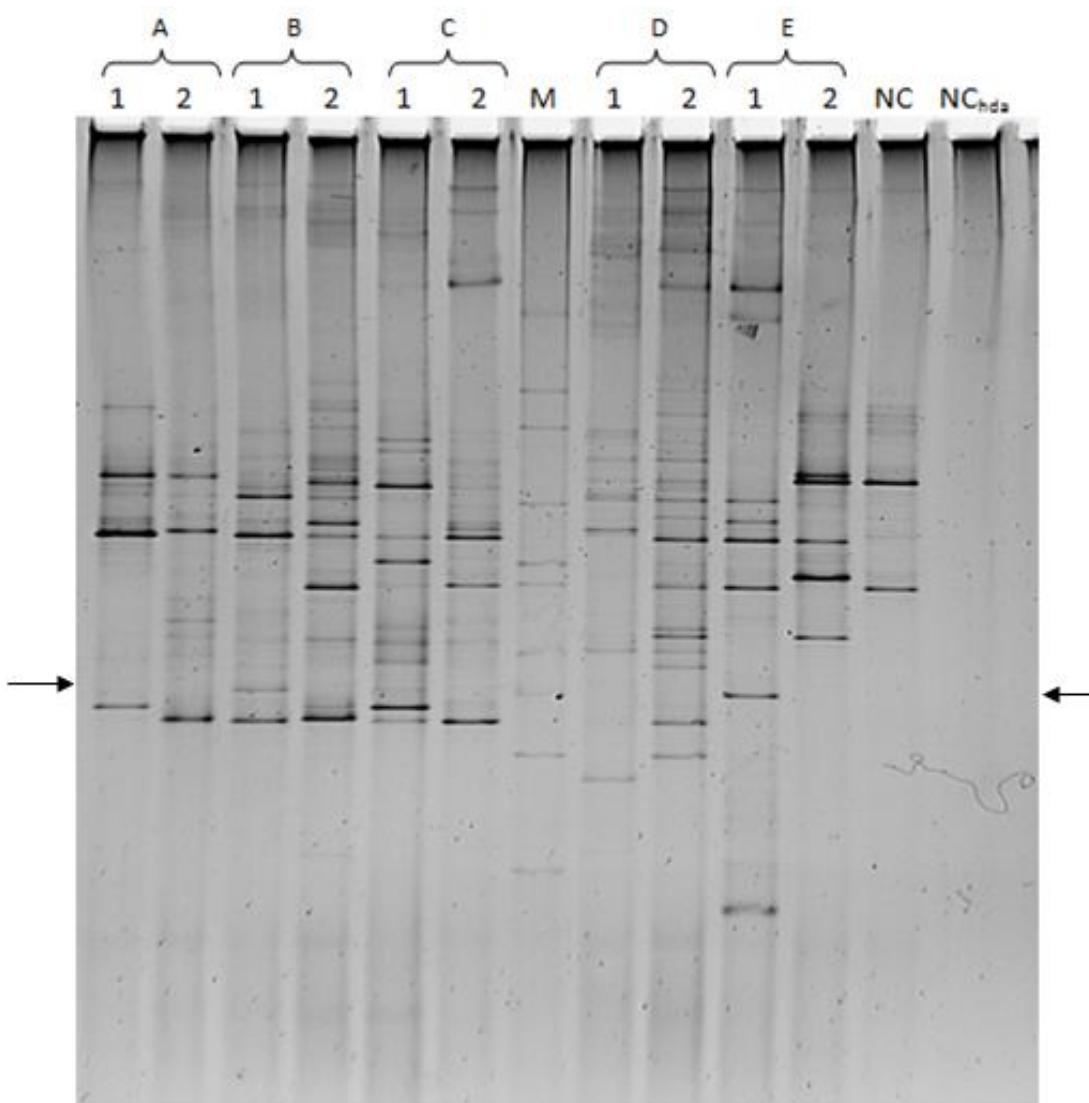
4.1.7 Odstranjevanje rastlinskih delcev s filtracijo

Ker so bili poskusi preprečevanja pomnoževanja kloroplastne rDNA neuspešni, smo žeeli rastlinski material iz vzorcev odstraniti še pred izolacijo skupne mikrobne DNA in pomnoževanjem s PCR. Poskusne vzorce čebeljega kruhka, ki smo jih pripravili sami, smo pred izolacijo DNA filtrirali čez filtre Minisart s premerom por $5 \mu\text{m}$. Filtrat smo pobarvali s fluorescentnim barvilom akridin oranž ter ga pregledali pod epifluorescentnim mikroskopom (slika 18) in v njem iskali bakterije ter druge mikroorganizme, ki so prešli čez pore filtra.



Slika 18: Z epifluorescentnim mikroskopom posneta slika cvetnega prahu pred (levo) in po filtraciji (desno)

Z metodami izolacije A, B, C, D in E, ki so opisane v poglavju 3.3.4 Izolacija bakterijske DNA, smo nato iz tako pripravljenih vzorcev izolirali skupno mikrobno DNA in preverili, kateri postopek je omogočil izolacijo največje količine DNA. Količino DNA, ki smo jo izolirali, smo ugotavljali s spektrofotometrom NanoVue™. Izkazalo se je, da je bila koncentracija DNA v vseh primerih prenizka za uspešno spektrofotometrično analizo (ni prikazano). Kljub temu smo (zaradi predhodnih izkušenj) nadaljevali delo z molekularnimi tehnikami PCR in DGGE. Zaradi izjemno nizke koncentracije DNA smo se odločili za vgnezdno reakcijo PCR, kjer smo v prvi stopnji z 19 cikli uporabili par začetnih oligonukleotidov FD1 in NadkarniR, v drugi stopnji s 35 cikli pa par začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2. Analizirali smo dva vzorca vsebine satnih celic, ki smo ju sami pripravili. Rezultati so prikazani na sliki 19.



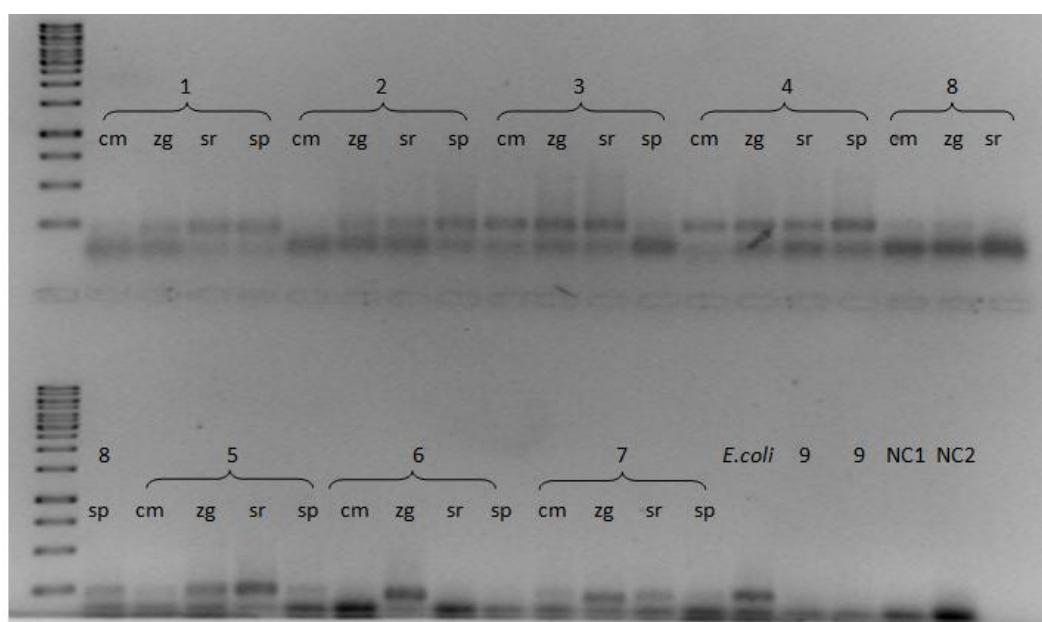
Slika 19: Gelska elektroforeza DGGE dveh filtriranih vzorcev (1 in 2) po različnih metodah izolacije DNA (A, B, C, D, E). Izvedli smo vgnezdeno reakcijo PCR s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in NadkarniR (19 ciklov) ter HDA1-GC in HDA2 (35 ciklov). Črka 'M' označuje standard DGGE, 'NC' negativno kontrolo prve stopnje vgnezdenje reakcije PCR, 'NC_{hda}' pa negativno kontrolo druge stopnje vgnezdenje reakcije PCR. Puščici ob robu gela nakazujeta mesto, kjer se je v predhodnih poskusih ustavil pomnožek PCR s kloroplastno DNA.

Ugotovili smo, da so različne metode izolacije DNA omogočile nastanek različnih profilov lis na gelu DGGE. Intenziteta lise, značilne za kloroplastno DNA, je bila v primerjavi z drugimi lisami praviloma manj intenzivna, kar je nakazovalo, da je bila filtracija vsaj deloma uspešna. Zaskrbljujoče pa je, da so bili profili istega vzorca po izolaciji DNA z različnimi metodami različni, kar kaže, da ima izbor metode izolacije DNA iz uporabljenih vzorcev specifičen vpliv na pomnoževanje ribosomske rDNA, kar ni sprejemljivo. Ker se je tudi negativna kontrola nespecifično pomnoževala, je precej verjetno, da je v uporabljenih vzorcih tako malo DNA, da se zaradi uporabe vgnezdenje reakcije PCR in (pre)velikega števila ciklov pomnožujejo predvsem (ali v celoti) nespecifični produkti.

4.2 ANALIZA SESTAVE MIKROBIOTE ČEBELJEGA KRUHKА

Z metodo DGGE smo želeli preveriti ali obstajajo razlike v sestavi mikrobne združbe čebeljega kruhka v različnih satnih celicah ter ali obstajajo razlike tudi med vertikalnimi tretjinami čebeljega kruhka iz istih satnih celic oziroma medom, ki prekriva čebelji kruhek v satnih celicah.

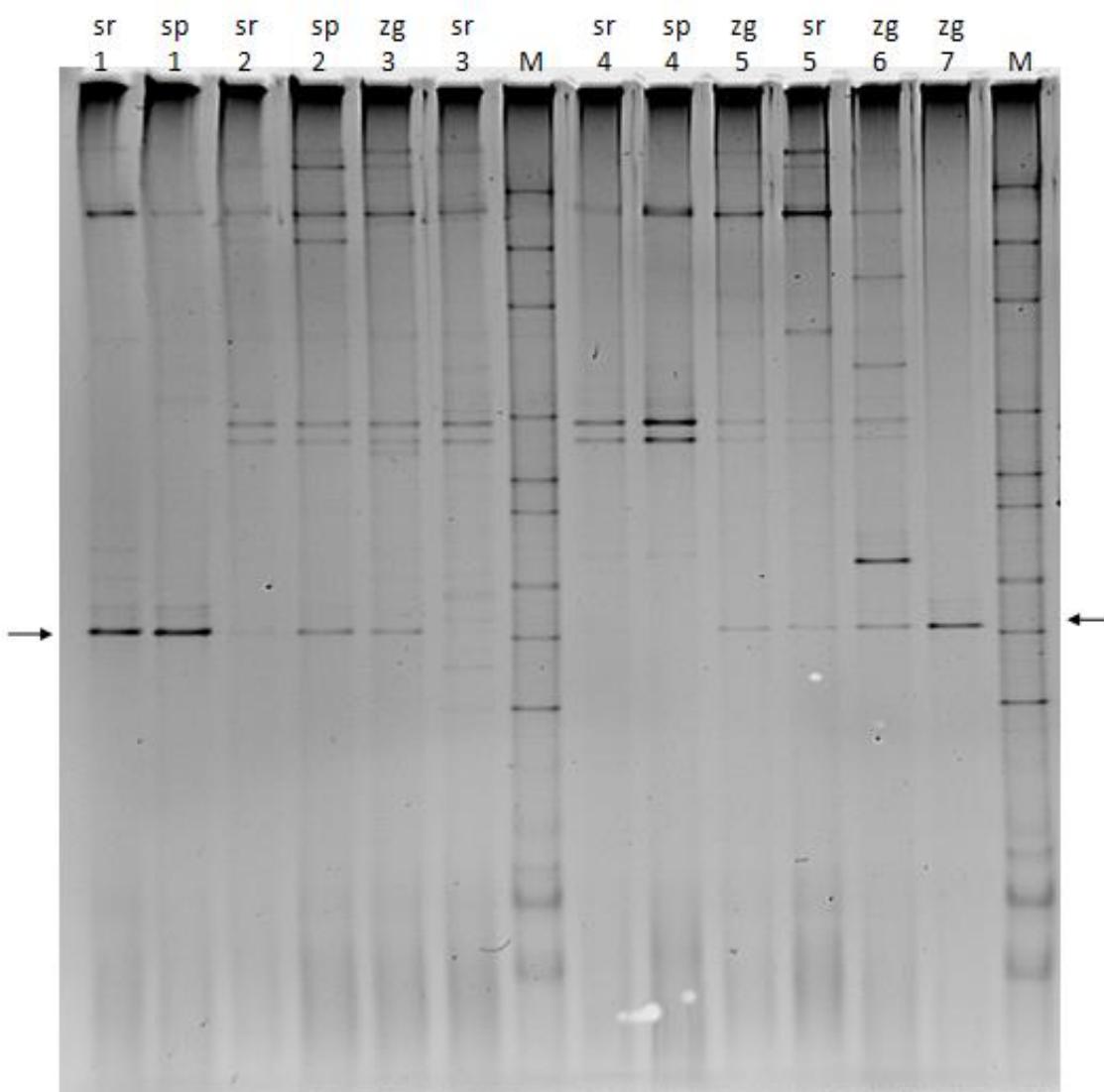
Glede na rezultate optimizacijskih poskusov, v katerih smo analizirali različne načine priprave vzorcev ter izolacije in pomnoževanja bakterijske DNA, smo se odločili, da bomo vzorce za končno analizo filtrirali, saj smo tako zmanjšali intenziteto lise, ki jo predstavlja kloroplastna DNA in ojačali druge, za katere smo predvidevali, da so bakterijskega izvora. Filracijo smo izvedli s filtri Minisart s premerom por 5 µl. Skupno mikrobnou DNA smo izolirali po metodi D (opisana v poglavju 3.3.4 Izolacija bakterijske DNA), ki vključuje stresalec Precellys 24 za lizo celic in fenol-kloroformno ekstrakcijo DNA. Zanjo smo se odločili zato, ker je najmanj časovno potratna in glede na ostale preizkušene metode ni kazala slabših rezultatov. Pomnoževanje DNA smo izvedli z enostopenjsko reakcijo PCR, ki je vsebovala 35 ciklov s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2. Za ta postopek smo se odločili, ker nismo želeli omogočiti nastanka nespecifičnih pomnožkov, ki so sicer nastajali pri vgnezdeni reakciji PCR. Uspešno pomnožene produkte smo analizirali z gelsko elektroforezo DGGE.



Slika 20: Slika agarognega gela po elektroforezi pomnoženih produktov reakcije PCR vzorcev za končno analizo mikrobiote čebeljega kruhka. Zaporedna številka označuje satno celico, iz katere je bil vzeti vzorec čebeljega kruhka, oznake 'sp', 'sr', in 'zg' označujejo spodnjo, srednjo in zgornjo tretjino vsebine satne celice. Oznaka 'cm' označuje vzorec medu nad cvetnim prahom. Številki 9 sta ponovitvi testega vzorca, ki smo ga sami pripravili, 'E.coli' predstavlja pozitivno kontrolo reakcije PCR, 'NC1' in 'NC2' pa negativni kontroli reakcije PCR.

V enostopenjski reakciji PCR nismo uspeli pomnožiti vseh preučevanih vzorcev (slika 20).

Z metodo DGGE smo analizirali le uspešno pomnožene produkte reakcije PCR (slika 21).



Slika 21: Gelska elektroforeza DGGE vzorcev za končno analizo mikrobiote čebeljega kruhka. Zaporedna številka označuje satno celico, iz katere je bil vzorec čebeljega kruhka, oznake 'sp', 'sr', in 'zg' označujejo spodnjo, srednjo in zgornjo tretjino vsebine satne celice. Črka 'M' označuje standard DGGE. S puščicami je označeno pojavljanje kloroplastne rDNA.

Od vseh vzorcev nam je uspelo pridobiti le nekaj dovolj dobrih profilov mikrobiote čebeljega kruhka iz satnih celic. Različni profili DGGE sicer odražajo različno sestavo mikrobiote v preiskovanih vzorcih, vendar se pri večini vzorcev pojavljajo nekatere lise na istih mestih.

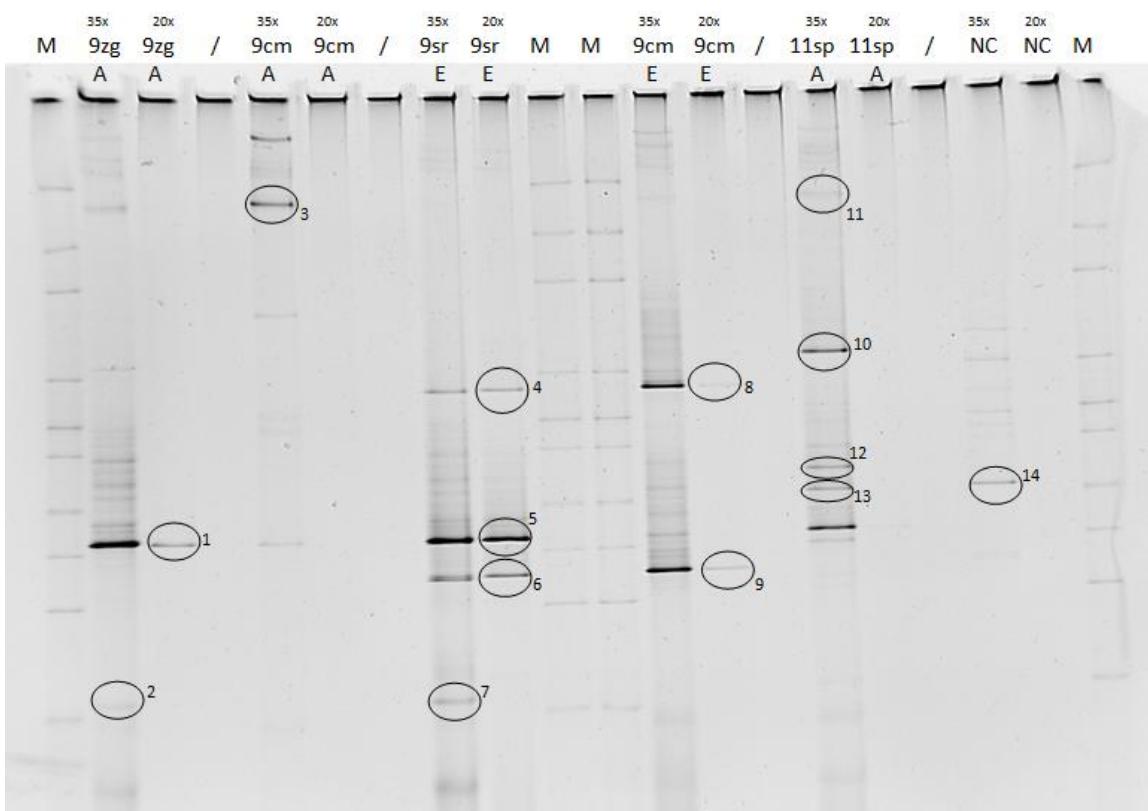
Profili iz iste satne celice so si med seboj precej podobni. Večinoma vsebujejo iste lise, ki pa se na nekaterih mestih razlikujejo v intenziteti posameznih lis. Pri profilih, ki vsebujejo intenzivnejše lise, lahko zaznamo tudi večje število drugih lis. Kljub temu lahko opazimo, da ti profili vsebujejo največ dve jasno vidni dodatni lisi, sicer pa se ostale pojavljajo na istih mestih pri obeh profilih.

V profilih različnih satnih celic lahko opazimo, da se pri vseh vzorcih različno intenzivno pojavlja lisa, ki se nahaja med prvo in drugo liso standarda DGGE. Pri večini vzorcev (razen pri 1 in 7) sta prisotni dve lis, ki se nahajata pod četrto liso glede na standard DGGE. Opazna je tudi lisa, ki se pojavlja pri večini vzorcev in se glede na standard DGGE nahaja tik nad osmo liso ter je na sliki označena s puščicama – ta lisa predstavlja domnevno kloroplastno rDNA. Pri vzorcih lahko opazimo tudi nekaj drugih manj izrazitih lis. Najpestrejši profil predstavlja vzorec 6, ki vsebuje vse prej omenjene lise ter še dodatne tri, ki niso vidne pri nobenem drugem vzorcu. Pri vzorcih 1sr, 2sp, 3 in 5 se pojavljajo lise nad prvo liso glede na standard DGGE. Med seboj so si najbolj podobni profili vzorcev 1 in 7 ter 2, 3, 4 in 5, tudi 6.

Profili mikrobnih združb v čebeljem kruhku so si med seboj bolj podobni glede na celico kot pa na vertikalno tretjino. Kljub filtraciji in predhodnim poskusom so se še vedno pojavili pomnožki kloroplastne rDNA, ki se je verjetno sprostila pri zamrzovanju in odmrzovanju vzorcev. Profili niso bogatejši od profilov iz predhodnih poskusov, kar nakazuje na to, da je bilo v teh vzorcih prisotnih manj mikrobnih vrst, ki pa so sicer bile količinsko bolj zastopane.

4.2.1 Analiza sekvenc izbranih lis na gelu DGGE

S sekvenciranjem DNA iz glavnih lis na gelu DGGE smo poskušali ugotoviti, katere mikrofone vrste so prisotne v vzorcih čebeljega kruhka. Uporabili smo vzorce, ki so jih pripravili na Oddelku za biologijo in iz katerih smo izolirali DNA po postopkih A in E, ki smo ju opisali v poglavju 3.3.4 Izolacija bakterijske DNA. Tako pridobljeno DNA smo pomnožili v 20 in 35 ciklih reakcije PCR z začetnimi oligonukleotidi HDA1-GC in HDA2. Želeli smo namreč pomnožiti dovolj DNA za nadaljnje analize (sekvenciranje). Na sliki 22 je prikazan poliakrilamidni gel z izbranimi lisami, ki smo jih izrezali in poslali na sekvenciranje. Postopek izrezovanja in pridobivanja DNA iz gela DGGE je opisan v poglavju 3.3.8 Postopki pridobivanja DNA za sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja teh lis so prikazani v preglednici 10.



Slika 22: Slika poliakrilamidnega gela DGGE, iz katerega smo izrezali izbrane lise za pridobivanje sekvenc. Zaporedna številka na vrhu slike označuje vzorec, ki vsebuje izbrane lise, črki A in E različni metodi izolacije DNA, 'NC' sta negativni kontroli reakcije PCR, 'M' je standard DGGE. S številko označeni krogi prikazujejo izbrane lise, ki smo jih izrezali in poslali na sekvenciranje.

Sekvence smo od podjetja Microsynth prejeli v računalniških formatih .ab1 in .fasta ter jih obdelali po istem postopku kot je opisan v poglavju 3.3.9 Analiza sekvenc. V sekvenci smo odstranili del začetnega oligonukleotida HDA1-GC (male črke) in ga pri analizi nismo upoštevali, razen pri lisi 11, ki je brez tega dela prekratka za obdelavo. Upoštevali smo le rezultate, ki se nahajajo nad mejo zaupanja 50 %. V preglednici 10 so prikazani dobljeni rezultati orodij Classifier in SeqMatch s spletnne strani RDP ter algoritma megablast s spletnne strani NCBI. V oklepaju je pri uporabi orodja Classifier navedena meja zaupanja (ang. Confidence Threshold), pri uporabi orodja SeqMatch najvišji izračun podobnosti (ang. S_ab score), pri uporabi programa megablast pa najvišji procent identifikacije (ang. Ident). Rezultatov nekaterih lis (2, 4, 5, 7, 8, 9, 12 in 13) nismo uspeli pridobiti zaradi slabe kvalitete sekvence.

Preglednica 10: Razvrstitev rezultatov z orodji Classifier in SeqMatch s spletno strani RDP ter s programom megablast s spletno strani NCBI

Lisa na gelu DGGE	Identifikacija, kot jo predlaga orodje Classifier (meja zaupanja)	Identifikacija, kot jo predlaga orodje SeqMatch (izračun podobnosti)	Identifikacija, kot jo predlaga program megablast (procent identifikacije)
1	domena <i>Bacteria</i> (100 %) deblo <i>Cyanobacteria/Chloroplast</i> (100 %) razred <i>Chloroplast</i> (100 %) družina <i>Chloroplast</i> (100 %) rod <i>Streptophyta</i> (100 %)	<i>Cucumis sativus</i> (1.000) uncultured bacterium (1.000) <i>Trewia nudiflora</i> (1.000) <i>Ricinus communis</i> (1.000) <i>Morus indica</i> (1.000)	Uncultured <i>Trichodesmium</i> (100 %) <i>Cucumis melo</i> (100 %) Uncultured bacterium isolate DGGE gel band (100 %) <i>Morus mongolica</i> chloroplast (100 %) Uncultured eukaryote chloroplast gene (100 %) Uncultured <i>Halospirulina</i> sp. (100 %) <i>Rosa odorata</i> var. <i>gigantea</i> chloroplast (100 %)
3	domena <i>Bacteria</i> (100 %) deblo <i>Firmicutes</i> (100 %) razred <i>Bacilli</i> (100 %) red <i>Lactobacillales</i> (68 %) družina <i>Lactobacillaceae</i> (63 %) rod <i>Lactobacillus</i> (58 %)	<i>Lactobacillus kunkeei</i> (1.000) uncultured <i>Lactobacillus</i> sp. (1.000) uncultured <i>Bacilli</i> bacterium (1.000)	<i>Lactobacillus kunkeei</i> (100 %)
6	domena <i>Bacteria</i> (100 %) deblo "Proteobacteria" (100 %) razred <i>Alphaproteobacteria</i> (100 %) red <i>Rhizobiales</i> (99 %) družina <i>Rhizobiaceae</i> (58 %) rod <i>Ensifer</i> (54 %)	uncultured <i>Bartonella</i> sp. (1.000) <i>Brucella melitensis</i> biovar <i>Suis</i> (1.000) <i>Brucella melitensis</i> biovar <i>Canis</i> (1.000) <i>Zoogloea ramigera</i> (1.000) <i>Sinorhizobium</i> sp. (1.000) uncultured bacterium (1.000) uncultured alpha proteobacterium (1.000)	Uncultured bacterium (100 %) <i>Ensifer</i> sp. (100 %) <i>Mesorhizobium</i> sp. (100 %) <i>Ochrobactrum</i> sp. (100 %) <i>Sinorhizobium medicae</i> (100 %) <i>Mesorhizobium sangaii</i> (100 %)
10	domena <i>Bacteria</i> (100 %) deblo "Proteobacteria" (98 %) razred <i>Gammaproteobacteria</i> (94 %)	<i>Candidatus Gilliamella apicola</i> (1.000) uncultured gamma proteobacterium (1.000) <i>Pasteurellaceae</i> bacterium (1.000) <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium (1.000)	<i>Gilliamella apicola</i> (99 %) <i>Pasteurellaceae</i> bacterium (99 %) Uncultured gamma proteobacterium (99 %)

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 10. Razvrstitev rezultatov z orodji Classifier in SeqMatch s spletno strani RDP ter s programom megablast s spletno strani NCBI

Lisa na gelu DGGE	Identifikacija, kot jo predlaga orodje Classifier (meja zaupanja)	Identifikacija, kot jo predlaga orodje SeqMatch (izračun podobnosti)	Identifikacija, kot jo predlaga program megablast (procent identifikacije)
11	domena <i>Bacteria</i> (82 %) deblo <i>Firmicutes</i> (56 %)	<i>Sulfobacillus acidophilus</i> (0.814) <i>Sulfobacillus</i> sp. (0.814) uncultured <i>Sulfobacillus</i> sp. (0.829)	Uncultured <i>Lactobacillus</i> sp. (92 %) Uncultured <i>Pediococcus</i> sp. (92 %) Uncultured bacterium (89 %) <i>Pediococcus</i> sp. (89 %) <i>Lactobacillus fermentum</i> (88 %)
14*	domena <i>Bacteria</i> (100 %) deblo "Proteobacteria" (100 %) razred <i>Betaproteobacteria</i> (100 %) red <i>Burkholderiales</i> (100 %) družina <i>Alcaligenaceae</i> (100 %) rod <i>Achromobacter</i> (52 %)	<i>Alcaligenes</i> sp. (1.000) <i>Achromobacter denitrificans</i> (1.000) <i>Achromobacter xylosoxidans</i> subsp. <i>null</i> (1.000) <i>Alcaligenes faecalis</i> (1.000) unidentified bacterium (1.000) uncultured <i>Alcaligenes</i> sp. (1.000)	Uncultured microorganism (98 %) <i>Achromobacter</i> sp. (98 %) <i>Achromobacter spiritinus</i> (98 %) <i>Achromobacter xylosoxidans</i> (98 %) Uncultured bacterium (98 %) <i>Collimonas pratensis</i> (98 %) <i>Alcaligenes faecalis</i> (98 %) <i>Achromobacter spanius</i> (98 %)

*Lise 14 (razred *Betaproteobacteria*) pri končni analizi nismo upoštevali, ker gre za kontaminacijo, ki se je pokazala pri negativni kontroli.

Sekvence, ki smo jih analizirali:

- Lisa 1: 5'-TTG CTT CTT CTC CGG GAA AAG AAG TTC ACG ACC CGT AGG CCT TCT ACC TCC ACG CGG CAT TGC TCC GTC AGG CTT TCG CCC ATT GCG GAA AAT TCC CCA-3'
- Lisa3: 5'-AGT GTT AAC AGT TAC TCT AAC ACT TGT TCT TTA ACA ACA GAG TTT TAC GAT CCG AAA ACC TTC ATC ACT CAC GCG GCG TTG CTC CAT CAG ACT TTC GTC CAT TGT GGA AGA TTC CCT A-3'
- Lisa 6: 5'-TTC ACC GGT GAA AGA GCT TTA CAA CCC TAG GGC CTT CAT CAC TCA CGC GGC ATG GCT GGA TCA GGC TTG CGC CCA TTG TCC AAT ATT CCC CA-3'
- Lisa 10: 5'-CAT CAN CGA AAG TAC TTT ACA ACC CGA AGG CCT TCT TCA TAC ACG CGG CAT GGC TGC ATC AGG GTT CCC CCC ATT GTG CAA TAT TCC CCA-3'
- Lisa 11: 5'-CCT TCN TCA CTC ACG CGG CGT TGC TCC ATC NNA CTT TCN NCC NTT GTG GAA NAT TCC CTA ctg ctg cct ccc gta gga gtc ccc ccg ngc ccc cgc ccc gcc egg ggc ccc egg g-3'
- Lisa14: 5'-TTA ACC CNT GNC GTT TCT TTC CTG CCA AAA GTG CTT TAC AAC CCG AAG GCC TTC ATC GCA CAC GCG GGA TGG CTG GAT CAG GGT TTC CCC CAT TGT CCA AAA TTC CCC A-3'

4.2.2 Gojenje in analiza bakterij iz čebeljega kruhka

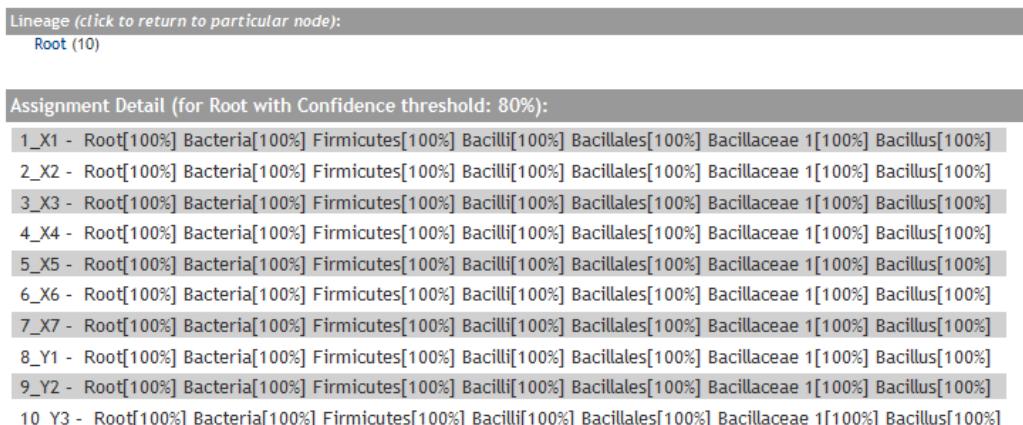
Ker smo imeli težave pri poskusu molekularne opredelitev mikroorganizmov iz čebeljega kruhka, smo se odločili, da bomo bakterije iz vzorcev poskusili gojiti na mikrobioloških gojiščih in tudi na takšen način ugotoviti, katere bakterijske vrste so tam prisotne. Uporabili smo vzorce, ki smo jih pripravili iz čebeljega satja, jih ustrezno raztopili in redčili ter gojili na izbranih gojiščih v aerobnih in anaerobnih razmerah. Po gojenju v anaerobnih razmerah nismo zaznali bakterijske rasti. Kolonije, ki so zrasle v aerobnih razmerah, smo precepili do čistih kultur. Pridobili smo deset kolonij, ki smo jih poimenovali X1 do X7 ter Y1, Y2 in Y3.



Slika 23: Prikaz tipične bakterijske rasti iz čebeljega kruhka

Iz čistih kultur smo izolirali DNA in jo pomnožili s parom začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R v 20 ciklih. Producete reakcije PCR smo očistili s komercialnim kompletom High Pure PCR Product Purification Kit ter jih poslali na sekvenciranje v podjetje Microsynth v Švico, kjer so izvedli metodo sekvenciranja z dideoksinukleotidi po Sangerju s kapilarno elektroforezo. Uporabili so sekvenčni začetni oligonukleotid FD1, ki smo jim ga poslali skupaj z vzorci. Dobljene sekvene smo analizirali s programom Classifier in SeqMatch s spletno strani RDP. Rezultati poizvedbe so prikazani v prilogah D do M. Analiza je pokazala, da so vsi izolati pripadali bakterijskemu rodu *Bacillus* (slika 24).

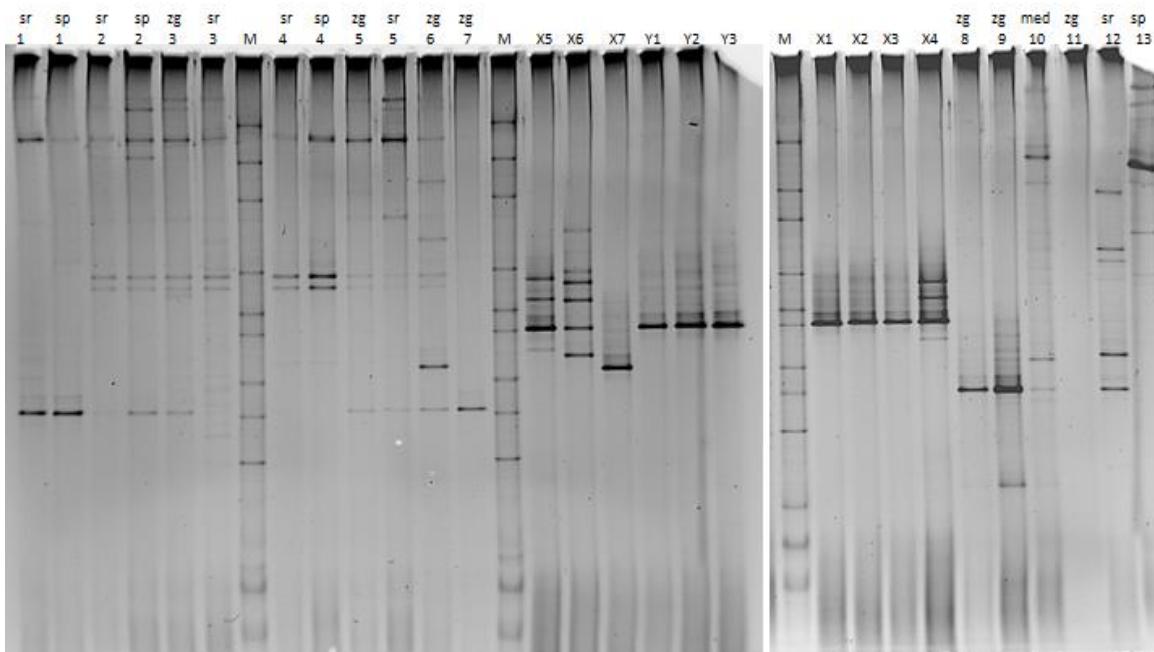
Classifier: RDP Naive Bayesian rRNA Classifier Version 2.10, October 2014
 Taxonomical Hierarchy: RDP 16S rRNA training set 10 with 16S gene copy number from rrnDBv4.2.2
 Query File: classifier_seq_upload2180639770450844415.FASTA
 Query Submit Date: Wed Mar 11 07:38:17 EDT 2015



Slika 24: Rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljenih sekvenč iz čistih kultur z RDP Classifier

Poizvedbo smo nadaljevali z orodjem SeqMatch, saj nas je zanimalo, ali vse čiste kulture izhajajo iz iste vrste. Na podlagi te analize sklepamo, da je največ sekvenc izolatov podobnim sekvencam bakterij iz vrste *Bacillus pumilus* (X2, X3, X4, X5, X7, Y1, Y2), sledijo predstavniki iz vrst *B. altitudinis* (X2, X3, X4), *B. cereus* (X1, Y3), *B. thuringiensis* (Y3) in *B. licheniformis* (X6).

V nadaljevanju nas je zanimalo ali lahko te organizme zasledimo tudi pri molekularni analizi skupne mikrobne DNA čebeljega kruhka. Zato smo izolirano DNA čistih kultur pomnožili v reakciji PCR s parom začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2 (35 ciklov) ter produkte skupaj s produkti skupne mikrobne DNA vzorcev čebeljega kruhka za končno analizo primerjali na gelu DGGE. Na sliki 25 lahko opazimo, da lis, ki so prisotne pri vzorcih čistih kultur bakterij iz rodu *Bacillus*, ne zasledimo tudi v profilih čebeljega kruhka. Pri čistih kulturah X4, X5 in X6 lahko opazimo, da je prisotnih več lis, kar bi lahko pomenilo, da kulture niso bile popolnoma čiste, ali pa da so bile čiste, vendar v genomu vsebujejo po več kopij genov za 16S rRNA. Če se te med seboj že malo razlikujejo v ključnih regijah, ki vplivajo na denaturacijski profil pomnoženih odsekov DNA (predvsem regije bogate z AT-pari), se to lahko močno pozna pri hitrosti potovanja pomnožkov PCR v prisotnem naraščajočem denaturantu na gelu DGGE.



Slika 25: Gelska elektroforeza DGGE analiziranih vzorcev mikrobiote čebeljega kruhka v primerjavi z gojenimi sevi iz čebeljega kruhka. Zaporedna številka označuje satno celico, iz katere je bil vzeti vzorec čebeljega kruhka, oznake 'sp', 'sr', in 'zg' označujejo spodnjo, srednjo in zgornjo tretjino vsebine satne celice. Oznaka 'med' pomeni, da je bil pregledan vzorec medu. Črka 'M' označuje standard DGGE. Črki X in Y prikazujeta satni celici, iz katere smo gojili seve iz čebeljega kruhka. Zaporedna številka označuje čisto kulturo, zraslo iz vzorca čebeljega kruhka iz satne celice X ali Y.

5 RAZPRAVA

O čebelah in medu je veliko znanega in napisanega. O čebeljem kruhku, biokemijski pretvorbi snovi v njem in o prisotnih mikroorganizmih vemo manj, so pa raziskovalci v zadnjem času opisali nekaj raziskav, v katerih so preučevali mikrobioto čebeljega kruhka in kako naj bi ta vplivala na njegovo obstojnost in hranilno vrednost (Gilliam, 1979a; Gilliam, 1979b; Gilliam in sod., 1989; Vasquez in Olofsson, 2009; Anderson in sod., 2011; Mattila in sod., 2012; Anderson in sod., 2013). Precej več raziskav je bilo usmerjenih v mikrobioto čebeljega prebavnega trakta (Jeyaprakash in sod., 2003; Mohr in Tebbe, 2006; Babendreier in sod., 2007; Cox-Foster in sod., 2007; Martinson in sod., 2011; Ahn in sod., 2012; Engel in sod., 2012; Moran in sod., 2012; Engel in sod., 2014). Prva, ki je raziskovala mikrobioto čebeljega kruhka, je bila dr. Martha Gilliam, ki je z gojitvenim pristopom in z biokemijskimi testi poskušala identificirati posamezne predstavnike mikrobiote čebeljega kruhka. Iz vzorcev je najpogosteje izolirala bakterije iz rodu *Bacillus*. Ker se je domnevalo, da je prisotna mlečna kislina ključna za konzervacijo čebeljega kruhka, sta se Vasquez in Olofsson (2009) prav tako z gojitvenimi tehnikami osredotočila na mlečnokislinske bakterije, ki so prisotne v čebeljem kruhku. V svoji raziskavi sta ugotovila, da so pri izvedbi mlečnokislinske fermentacije najpomembnejši bakterijski predstavniki iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, vendar sta istočasno opozorila, da je potrebno ugotoviti ali pri tem sodelujejo tudi druge bakterije. Mattila in sodelavci (2012) so izvedli molekularno-biološko raziskavo mikrobiote čebeljega kruhka, v kateri so iz vzorcev izolirali molekule RNA, ki izhajajo iz živih in aktivnih mikroorganizmov. Pokazali so, da so v čebeljem kruhku prisotne aktivne bakterije in da prevladujejo bakterije iz rodov *Oenococcus* in *Paralactobacillus*, ki sodijo v razred *Bacilli* po Gramu pozitivnih firmikutov. Anderson in sodelavci (2013) so preučevali mikrobioto čebeljega kruhka na bolj običajen način, ko gre za molekularno-biološke pristope, torej na osnovi analize skupne mikrobne DNA in ugotovili, da je v vzorcih prevladovala po Gramu pozitivna bakterijska vrsta *Lactobacillus kunkeei*. Že v naslednjem letu pa so Anderson in sodelavci (2014) objavili raziskavo, v kateri so ugotovili, da je v čebeljem kruhku prisotno premajhno število bakterij, ki bi lahko s fermentacijo opravile ključno metabolno pretvorbo čebeljega kruhka. Okolje v čebeljem kruhku pa naj bi bilo zaradi dodatka medu, nektarja in izločkov čebeljih žlez neugodno in zato naj ne bi podpiralo mikrobne rasti.

Pri shranjevanju cvetnega prahu v panj naj bi bil ključni mikrobiološki dejavnik stik čebeljega organizma s cvetnim prahom. Pri tem je vključena tako mikrobiota cvetnega prahu kot mikrobiota čebel, kamor spadajo mikroorganizmi, ki jih najdemo na površini različnih delov čebeljega telesa ali mikroorganizmi iz čebeljega prebavnega trakta. V panjskem okolju postanejo pomembni tudi drugi dejavniki, ki zavirajo oziroma pospešujejo rast določenih mikroorganizmov: razpoložljivost hranil, pH, kisik, temperatura, vlaga, osmotski potencial, ipd. (Snowdon in Cliver, 1996; Anderson in sod., 2013). Čeprav naj bi bila mlečna kislina ključna pri pretvorbi cvetnega prahu v čebelji kruhek, točnega mehanizma pretvorbe doslej še niso opisali.

Vzorci, ki smo jih preiskovali v magistrski nalogi, so bili pridobljeni v okviru doktorske disertacije Blaža Podrižnika, ki je preiskoval biološko aktivnost in skladiščenje cvetnega prahu v celicah satja kranjske čebele. Zato so bili vzorci predhodno razdeljeni na tretjine po vertikali (slika 6), v njih pa so ugotavljal vsebnost mlečne kislina. Ugotovili so, da vsebnost mlečne kislina narašča po vertikali. Pričakovali smo, da se bo zato tudi mikrobiota čebeljega kruhka razlikovala glede na vertikalo, saj mlečna kislina znižuje pH okolja in tako selektivno preprečuje rast neacidofilnim mikroorganizmom. V nalogi smo zato želeli ugotoviti, kakšna je sestava mikrobiote čebeljega kruhka, ali obstajajo razlike v sestavi mikrobiote čebeljega kruhka med posameznimi satnimi celicami ter ali obstajajo razlike tudi znotraj posameznih satnih celic po vertikalnem preseku.

Vzorcev cvetnega prahu na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiorno biotehnologijo doslej še niso preučevali. Več izkušenj imajo z vzorci vsebine prebavnega trakta človeka in živali, ki so po nekaterih parametrih bistveno drugačni. Zato so bile v začetnem delu nujne optimizacije postopkov za analizo vzorcev z molekularnimi tehnikami (izolacija DNA in PCR). Že po prvih poskusih se je izkazalo, da vzorci vsebujejo majhno število bakterij ali pa vsebujejo inhibitorje, ki motijo uspešno izvedbo uporabljenih molekularnih tehnik, saj nismo dobili želene pestrosti in kvalitete profilov, ki so običajni za DGGE.

Skupno mikrobno DNA smo iz vzorcev najprej izolirali po postopku, ki se na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiorno biotehnologijo rutinsko uporablja za izolacijo mikrobne DNA iz vzorcev zemlje, onesnaženih vod in vsebine prebavnega trakta. Po preverjanju uspešnosti izolacije DNA na agaroznem gelu smo ugotovili, da smo uspeli izolirati le majhno količino DNA (če sploh), saj na gelu ni bilo vidnih lis, značilnih za izolirano DNA. Po izkušnjah sodeč smo sklepali, da lahko v naslednjem koraku vseeno pomnožimo zadostno količino odsekov ribosomskih genov v reakciji PCR in pomnožke uporabimo za nadaljnjo analizo na DGGE. Pri pomnoževanju smo uporabili evolucijsko ohranjene začetne oligonukleotide HDA1-GC in HDA2, ker pa smo zaradi majhnega izplena izolirane DNA pričakovali in želeli povečati nizko koncentracijo produktov, smo reakcijo izvedli v 35 ciklih, kar je več kot običajno (25-30 ciklov). Po PCR smo pomnožke ločili z denaturacijsko gradientno gelsko elektroforezo. Pridobili smo šibke profile z majhnim številom jasnih (diskretnih) lis na gelu DGGE, poleg tega se je skoraj pri vseh vzorcih pojavljala lisa v isti liniji, kar po izkušnjah sodeč običajno pomeni, da gre za artefakt – to pomeni, da je rezultat najverjetneje posledica metodoloških postopkov in ni pomnožek dejanske DNA, ki se nahaja v vzorcu (Neilson in sod., 2013). V nadaljevanju smo poskušali ugotoviti:

- zakaj vsebujejo profili na gelu DGGE tako majhno število diskretnih lis,
- kako profile ojačati oz. povečati število opaženih lis na gelu DGGE in
- ali je lisa, ki se pri vseh vzorcih pojavlja na istem mestu, res metodološki artefakt.

Problema šibkih profilov smo se lotili na nivojih izolacije DNA in PCR. Postopek izolacije DNA smo poskušali optimizirati s tremi različnimi pristopi, preizkusili pa smo tudi šest modifikacij osnovnega protokola. Čeprav smo tokrat uspeli pridobiti pomnožke, se je pri analizi DGGE pokazalo, da so ti pomnožki najverjetneje posledica tehničnih napak pri delu. Namreč, vidni so bili pomnožki v negativnih kontrolah, posamezne lise v profilu iz negativnih kontrol pa so se ustavile na istih mestih kot nekatere lise v ostalih vzorcih. Ugotovili smo tudi, da so bili profili istih vzorcev (1A, 2A, 1D in 2D na slikah 8 in 9) različni (neponovljivi), kar ni sprejemljivo. Kljub vsemu smo iz gela lahko razbrali, da noben izmed uporabljenih postopkov izolacije DNA ni bil dovolj učinkovit, da bi na gelu DGGE bili vidni bogatejši profili z močnejšimi in številčnejšimi lisami, zato smo sklepali, da je v vzorcih prisotno premajhno število bakterij. Nastanek nespecifičnih produktov bi lahko razložili zaradi (pre)velikega števila ciklov v reakciji PCR. Ker postopka optimizacije izolacije DNA nismo uspeli izboljšati, smo poskušali profile na gelu DGGE ojačati na nivoju PCR. Za nadaljnjo izolacijo skupne mikrobne DNA iz čebeljega kruhka smo izbrali postopek D (opisan v poglavju 3.3.4 Izolacija bakterijske DNA), ki vključuje stresalec Precellys 24 za lizo celic in fenol-kloroformno ekstrakcijo DNA. Za ta postopek smo se odločili, ker je najmanj časovno potraten in glede na ostale preizkušene metode ni kazal slabših rezultatov.

Vgnezdena reakcija PCR je način, s katerim lahko izboljšamo učinkovitost reakcije PCR. V prvem delu vgnezdenje PCR s t. i. 'zunanjimi' začetnimi oligonukleotidi pomnožujemo daljši odsek tarčne DNA, pomnožek pa nato služi kot osnova za pomnoževanje s t. i. 'notranjimi' oz. 'vgnezdenimi' začetnimi oligonukleotidi, ki nalegajo znotraj prvotnega produkta (Erlich in sod., 1991). Rezultati v našem primeru so pokazali, da smo pridobili obogatene profile DGGE, kadar smo v prvi stopnji izvedli PCR z 20 cikli z zunanjima začetnima oligonukleotidoma FD1 in 926R, v drugi pa PCR s 35 cikli z vgnezdenima začetnima oligonukleotidoma HDA1-GC in HDA2. Problem, ki se je znova pojavil, je bil močan produkt pri negativni kontroli. Prav tako smo še vedno zaznali pojavljanje domnevnega artefakta, tj. najmočnejše lise v isti liniji, ki je bila prisotna že pri prejšnjih analizah DGGE.

V nadaljevanju smo poskušali raziskati identiteto omenjene lise, saj nas je zanimalo ali je ta lisa posledica kontaminacije ali gre za artefakt, obstajala pa je tudi možnost, da je mikrobnega izvora in da v čebeljem kruhku prevladuje ena sama mikrobna vrsta. Eden izmed vzorcev je pretežno vseboval le omenjeno liso, zato smo se odločili, da bomo izolirano DNA izbranega vzorca neposredno pomnožili v reakciji PCR z ohranjenimi začetnimi oligonukleotidi. Upali smo, da bomo pridobili dovolj kvalitetno sekvenco, da bi lahko ugotovili taksonomsko identiteto organizma, iz katerega sekvenca izhaja. Ugotovili smo, da DNA omenjene lise izhaja iz kloroplastov. V nadaljevanju smo iz gela DGGE pri nekaj izbranih vzorcih izrezali tiste dele, ki so vsebovali omenjeno liso. Analiza pridobljenih sekvenc je potrdila, da je DNA, ki se je pomnožila in v gelu predstavljal diskretno liso, kloroplastna rDNA, ki se od bakterijske rDNA bistveno ne razlikuje in se je

zato pomnoževala z evolucijsko ohranjenimi začetnimi oligonukleotidi. Glede na to, da je v vzorcih prevladoval cvetni prah, smo z izbranimi postopki molekularne analize pretežno analizirali rastlinski del v vzorcu.

Domnevali smo, da so bili profili DGGE šibki in pičli zato, ker je v izolirani DNA prevladovala kloroplastna DNA in so se reagenti verižne reakcije s polimerazo v večini porabili za pomnoževanje le-te. V nadaljevanju smo zato poskušali preprečiti pomnoževanje kloroplastne rDNA. Z enostopenjsko gradientno reakcijo PCR smo preverili ali morda sprememba temperature naleganja začetnih oligonukleotidov para HDA1-GC in HDA2 izboljša razmerje med pomnoževanjem rastlinske in bakterijske DNA. Ugotovili smo, da se kljub povišani temperaturi prileganja začetnih oligonukleotidov kloroplastna rDNA še vedno močno pomnožuje, na profilu DGGE pa ni opaznih novih bakterijskih lis.

V literaturi (Chelius in Triplett, 2001; Redford in sod., 2010; Shade in sod., 2013) smo zasledili, da je pojavljanje kloroplastne DNA pogost problem pri delu z rastlinskimi vzorci. Pomnoževanju kloroplastne rDNA bi se lahko izognili z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki ne pomnožujejo kloroplastne DNA. Kloroplastni geni za 16S rRNA so zelo podobni bakterijskim, saj evolucijsko izhajajo iz nekoč davno prostoživečih fototrofnih bakterij. Ker je rastlinska DNA v čebeljem kruhku očitno prisotna v višjih koncentracijah kot bakterijska, se zaradi ne dovolj zaostrenih pogojev pomnoževanja preferenčno pomnožuje in moti nadaljnje molekularne analize bakterijske DNA (Powell in sod., 2012). Chelius in Triplett (2001) sta analizirala ohranjene regije bakterijskih in kloroplastnih genov za 16S rRNA ter ustvarila specifičen začetni oligonukleotid 799F, ki preferenčno podvaja bakterijsko, ne pa kloroplastne DNA. Kloroplastni geni za 16S rRNA namreč vsebujejo štiri sebi lastna bazna mesta (pozicije 783, 784, 798 in 799), ki se ne ujemajo s sekvenco univerzalno ohranjenega bakterijskega začetnega oligonukleotida 799F. Ta mesta vplivajo na zmanjšano učinkovitost pomnoževanja kloroplastnega gena za 16S rRNA (Hanshew in sod., 2013). Uporabili smo začetni oligonukleotid, ki ga je opisal Nadkarni s sodelavci (2002) in čeprav ni bil namenoma ustvarjen za preprečevanje pomnoževanja kloroplastne DNA, smo ugotovili, da je njegova sekvenca komplement v literaturi opisanemu začetnemu oligonukleotidu 799F. S parom začetnih oligonukleotidov FD1 in NadkarniR smo pomnožili odseke ribosomskih genov bakterij iz vzorcev čebeljega kruhka. Pričakovali smo, da bo izbrani začetni oligonukleotid preprečil pomnoževanje kloroplastnih ribosomskih genov. V drugem koraku smo pomnožek prve reakcije PCR uporabili kot tarčo za pomnoževanje z začetnima oligonukleotidoma HDA1-GC in HDA2 in pomnožke te reakcije ločili na gelu DGGE. Ugotovili smo, da tudi tako nismo uspeli preprečiti pomnoževanja kloroplastne ribosomalne DNA. Znova smo opazili tudi pomnožke pri negativnih kontrolah. Zaradi nespecifičnega pomnoževanja negativnih kontrol pri vgnezdeni reakciji PCR smo to metodo opustili. Ugotovili smo tudi, da zaradi nespecifičnega pomnoževanja negativnih kontrol z vgnezdeno reakcijo PCR teh vzorcev ne bomo mogli uspešno analizirati z izbranimi začetnimi oligonukleotidi.

Odločili smo se, da stopimo korak nazaj in poskusimo rastlinsko DNA fizično odstraniti s filtriranjem vzorcev. Zavedali smo se, da bomo tako verjetno izgubili tudi del bakterijske populacije mikrobiote čebeljega kruhka, ker obstaja možnost, da so v čebeljem kruhku prisotne bakterije pritrjene na stene zrnc cvetnega prahu ali pa so večje od 5 µm in bi se v tem primeru zadržale na filtrirnih membranah. Vendar je filtracija predstavljala možnost za odstranitev rastlinskega materiala v vzorcu, ki je domnevno motil nadaljnje molekularne analize DNA mikrobiote čebeljega kruhka. Z epifluorescenčno mikroskopijo smo ugotovili, da skozi filtrne pore premera 5 µm domnevno preidejo zgolj bakterijske in morda manjše kvasne celice. Tudi na gelu DGGE je bila intenziteta lise, značilne za kloroplastno DNA, po filtraciji praviloma manj intenzivna, kar je nakazovalo, da je bila filtracija vsaj deloma uspešna. Zato smo se odločili, da bomo končne vzorce filtrirali. Ko smo analizirali končni set vzorcev, pa se je izkazalo, da filtracija ni bila tako učinkovita, kot smo pričakovali po predhodnih poskusih. Na gelu DGGE so namreč še vedno bile vidne lise, značilne za kloroplastno DNA.

Navkljub vsem težavam, smo želeli pridobiti vsaj delen vpogled v sestavo mikrobiote čebeljega kruhka. Vzorce za analizo smo filtrirali, da rastlinski del ni motil nadalnjih molekularnih tehnik. Skupno mikrobno DNA smo izolirali po postopku D in jo pomnožili v reakciji PCR z začetnimi oligonukleotidi HDA1-GC in HDA2, saj le tako ni prihajalo do nespecifičnih pomnožkov iz negativnih kontrol. Na koncu smo od vseh vzorcev pridobili profile mikrobiote čebeljega kruhka le iz 7 satnih celic, ki so bile po vertikali razdeljene na zgornjo, srednjo in spodnjo tretjino. Različni DGGE profili pomnožkov genov za mikrobno 16S rRNA odražajo različno sestavo mikrobiote v preiskovanih vzorcih. Čeprav so bili profili siromašni in smo pri večini vzorcev še vedno odkrili liso s kloroplastno DNA, lahko na podlagi dobljenih rezultatov ugotovimo, da so razlike v strukturi mikrobiote čebeljega kruhka opazne med različnimi satnimi celicami, ne pa znotraj posamezne satne celice. To pomeni, da so si profili mikrobne združbe čebeljega kruhka, ki prihajajo iz iste satne celice, bolj podobni, kot če med seboj primerjamo iste tretjine različnih satnih celic.

S sekvenciranjem izrezanih lis, z obdelavo sekvenc ter s primerjavo rezultatov na spletnih straneh RDP in NCBI smo ugotovili, da so v vzorcih bile prisotne po Gramu pozitivne bakterije iz debla *Firmicutes* ter po Gramu negativne bakterije iz debla *Proteobacteria*. V deblu firmikutov so prevladovale bakterije iz razreda *Bacilli*, od proteobakterij pa iz razredov *Alphaproteobacteria* in *Gammaproteobacteria*. Te bakterije so prisotne v čebeljem prebavnem traktu in se prav tako pojavljajo v čebeljem kruhku (Mattila in sod., 2012; Anderson in sod., 2013). Z veliko verjetnostjo lahko trdimo, da so v vzorcih prisotne bakterije vrste *Gilliamella apicola*, ki so jih v svoji raziskavi opisali tudi Engel in sodelavci (2012), prav tako obstaja velika verjetnost, da DNA dokaj intenzivne lise, ki se pri analizi vzorcev na več gelih DGGE nahaja med prvo in drugo liso standarda DGGE, izhaja iz bakterijske vrste *Lactobacillus kunkeei*. Te bakterije najbrž tvorijo večino mikrobiote čebeljega kruhka analiziranih vzorcev in se prav tako najpogosteje pojavljajo v

vzorcih mikrobiote čebeljega kruhka v raziskavi, ki so jo izvedli Anderson in sodelavci (2013). Z našimi rezultati pa ne moremo potrditi ali so posamezni organizmi te mikrobne združbe aktivni in karakteristični ali le prehodni in slučajno prisotni.

Bakterije iz čebeljega kruhka smo na koncu naše raziskave tudi gojili na mikrobioloških gojiščih v laboratoriju. Z aerobno inkubacijo smo izolirali in do čiste kulture očistili več sevov, ki so bili po Gramu pozitivni. Iz njih smo izolirali genomsko DNA, pomnožili ribosomske gene in jih poslali na sekvenciranje. Bioinformacijska analiza sekvenč je pri vseh izolatih pokazala, da so te bakterije najbolj podobne bakterijam iz petih vrst rodu *Bacillus*: *B. pumilus*, *B. altitudinis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* in *B. licheniformis*. Ti rezultati so v skladu z ugotovitvami raziskave dr. Marthe Gilliam (1979b), ki je prav tako iz čebeljega kruhka najpogosteje izolirala bakterije iz rodu *Bacillus*. Z analizo DGGE smo tudi ugotovili, da se pomnoženi deli ribosomskih genov iz teh bakterij ne pojavljajo v profilu lis celotne mikrobne združbe čebeljega kruhka.

Obstaja kar nekaj možnosti in verjetnih razlogov, zakaj z uporabljenimi postopki na DGGE nismo pridobili pestrejših profilov mikrobiote čebeljega kruhka. Morda je prišlo do napak že pri sami pripravi vzorcev, ki je bil za potrebe analize na vsebnost fenolov, protimikrobnih snovi in mlečne kisline centrifugiran 5 min pri 1500 x g. Možno je, da so bile bakterije močno pripete na pelodna zrna in so se zato zadržale na filtrih med filtracijo. Tudi če niso, so morda v čebeljem kruhu prisotne protimikrobnne snovi (Vasquez in Olofsson, 2009), ki lahko preprečijo rast nekaterih bakterij, razvoj pa dopuščajo le dominantnim vrstam, ki protimikrobnne snovi proizvajajo in so nanje odporne. Morda so prisotne tudi druge protimikrobnne snovi, katerih izvor so žleze čebel (Anderson in sod., 2014). Ravno zato je morda v samem vzorcu premalo (ali nič) bakterijskih celic, iz katerih bi lahko uspešno izvedli postopke izolacije DNA in PCR.

Na pomnoževanje izolirane DNA pri reakciji PCR lahko močno vpliva izbira uporabljenih začetnih oligonukleotidov, njihova koncentracija in temperatura naleganja. Pomembno vlogo igra tudi število uporabljenih ciklov. Največji problem je pri opisanem delu predstavljalno nespecifično pomnoževanje iz negativnih kontrol. Domnevamo, da pri premajhnih količinah DNA prihaja do nastajanja nespecifičnih produktov in so zato bili rezultati neponovljivi. Takšni rezultati niso zelo zanesljivi. Ni nam uspelo pripraviti optimalnega protokola PCR reakcije, ki bi močno namnožil ribosomske gene iz izolirane bakterijske DNA in bi onemogočil pomnoževanje kloroplastne ribosomske DNA.

Tudi metoda DGGE ima svoje omejitve, od katerih je najbolj očitna ta, da lahko na enem poliakrilamidnem gelu sočasno analiziramo razmeroma majhno število vzorcev (največ 20). Zato je pri večjem številu vzorcev nujna primerjava med geli, ki pa je zelo težavna. Zaradi napak pri pipetiranju in ročnem vlivanju gelov lahko prihaja do razlik v razporeditvi gradiента denaturanta, zato se lahko potovanje pomnožkov PCR na različnih gelih močno razlikuje.

Natančna in zanesljiva obdelava analiziranih vzorcev na izbrane načine in uporabljeni metode ni mogoča. Zaradi težav pri izolacijah DNA, nastajanju nespecifičnih produktov pri prevelikem številu ciklov v reakcijah PCR ter zaradi šibkih in siromašnih profilov na DGGE naši rezultati nakazujejo na to, da vzorci čebeljega kruhka najverjetneje vsebujejo premalo bakterij, da bi jih lahko uspešno analizirali z molekularnimi tehnikami. Prav tako so Anderson in sodelavci (2014) mnenja, da je v čebeljem kruhku prisotno premajhno število bakterij glede na število pelodnih zrn, zato tudi naj ne bi mogle izvajati fermentacije, ki bi bistveno pripomogla k višji hranilni vrednosti in biokemijski pretvorbi čebeljega kruhka.

6 SKLEPI

- Struktura mikrobiote čebeljega kruhka se med posameznimi satnimi celicami razlikuje. Prav tako se struktura mikrobiote medu, ki prekriva čebelji kruhek, razlikuje od strukture mikrobiote čebeljega kruhka. Hipoteze, da se vrstna sestava mikrobiote čebeljega kruhka spreminja po vertikali znotraj posamezne satne celice, nismo potrdili.
- Mikrobiota čebeljega kruhka je vrstno skromna, po naših rezultatih sodeč v njej prevladujejo po Gramu pozitivne bakterije iz vrste *Lactobacillus kunkeei*.
- Z molekularno analizo smo ugotovili, da so v vzorcih bile prisotne po Gramu pozitivne bakterije iz debla *Firmicutes* ter po Gramu negativne bakterije iz debla *Proteobacteria*. V deblu firmikutov so prevladovale bakterije iz rodu *Lactobacillus*, od proteobakterij pa iz redu *Rhizobiales* (*Alphaproteobacteria*) in iz družine enterobakterij (*Gammaproteobacteria*).
- Z gojitvenimi tehnikami smo ugotovili, da so v čebeljem kruhku prisotne tudi bakterije iz rodu *Bacillus*.
- V vzorcih čebeljega kruhka je veliko rastlinskega materiala, ki tudi vsebuje DNA in vpliva na uspešnost izvedbe nadalnjih molekularnih metod (PCR in DGGE).
- Pri izvajanju vgnezdeno PCR s premajhno koncentracijo matrične DNA je prišlo do nastanka naključnih pomnožkov, enako se je zgodilo pri uporabi enostopenjske PCR z velikim številom ciklov.
- Pomnoževanje kloroplastne DNA ni preprečilo niti spreminjanje temperature naleganja začetnih oligonukleotidov FD1 in 926R niti uporaba specifičnega začetnega oligonukleotida NadkarniR.
- Rastlinski material smo lahko do neke mere odstranili s filtriranjem vzorcev.

7 POVZETEK

Čebele v svojo prehrano vključujejo v satnih celicah skladiščen in presnovljen cvetni prah, t. i. čebelji kruhek, ki zanje predstavlja edini vir beljakovin. Ko nabrani cvetni prah odložijo v panj, se le-ta biokemijsko spremeni. Mehanizmi biokemijske pretvorbe cvetnega prahu v čebelji kruhek niso popolnoma znani. Uveljavljeno je prepričanje, da je čebelji kruhek posledica mlečnokislinske fermentacije. S to nalogo smo želeli ugotoviti, kakšna je sestava mikrobiote čebeljega kruhka, ali pri zorenju cvetnega prahu v čebelji kruhek prihaja do sprememb v strukturi mikrobne združbe in ali obstajajo razlike v sestavi mikrobne združbe čebeljega kruhka med posameznimi satnimi celicami.

Pri delu smo analizirali vzorce čebeljega kruhka, ki jih je v izhodišču pripravil Blaž Podrižnik z Oddelka za Biologijo Biotehniške fakultete za svojo doktorsko disertacijo. Na razpolago smo imeli majhno število primernih vzorcev, zato smo optimizacijo metod opravili na modelnih vzorcih, tj. tistih, ki predhodno niso bili testirani na vsebnost mlečne kisline ali pa smo jih sami pripravili. Že po prvih poskusih se je izkazalo, da na gelu DGGE dobimo šibke profile z majhnim številom lis, ter da se pri večini vzorcev pojavlja diskretna lisa, za katero smo domnevali, da gre za artefakt.

Najprej smo želeli ugotoviti, zakaj profili na DGGE vsebujejo tako majhno število lis. Možnosti so bile naslednje: morda vzorci vsebujejo majhno število bakterij, morda vsebujejo inhibitorje, ki motijo uspešno izvedbo molekularnih tehnik ali pa smo uporabili preveč robustno metodo izolacije DNA. Ugotovili smo, da tudi z različnimi postopki izolacije DNA nismo uspeli povečati koncentracije izolirane DNA. Z nadaljnjo analizo smo ugotovili, da je v vzorcih prisotna rastlinska kloroplastna DNA, ki moti molekularne raziskave. V nadaljevanju smo želeli preprečiti pomnoževanje le-te, saj smo domnevali, da so se reagenti verižne reakcije s polimerazo v večini porabili za pomnoževanje kloroplastne rDNA in so zato na gelu DGGE vidni le šibki profili pomnožkov ribosomskih genov. Z gradientno PCR smo ugotovili, da spremenjanje temperature naleganja začetnih oligonukleotidov ne spremeni razmerja med pomnoževanjem kloroplastne in bakterijske rDNA. Tudi uporaba specifičnega začetnega oligonukleotida, ki naj bi preprečeval pomnoževanje kloroplastne rDNA, ni bila uspešna. Z vgnezdeno PCR smo profile pomnožkov ribosomskih genov ojačali, vendar so se tudi pri negativnih kontrolah pojavili nespecifični pomnožki, profili pa so bili neponovljivi. Na koncu smo rastlinski material iz vzorcev do neke mere odstranili s filtracijo.

Iz filtriranih vzorcev smo v zadnjem delu naloge izolirali skupno mikrobno DNA, iz nje pomnožili odseke ribosomskih genov in pomnožke ločili z DGGE. Iz izbranih lis na gelu DGGE smo izolirali DNA, jo uporabili kot matrico v PCR in sekvencirali. Analiza sekvenc je pokazala, da organizmi, ki predstavljajo vidne lise na gelih DGGE, najverjetneje izhajajo iz bakterijskih vrst *Gilliamella apicola* ter *Lactobacillus kunkeei*, ki jih omenjajo tudi raziskovalci v svojih raziskavah in naj bi predstavljale del mikrobiote čebeljega prebavnega trakta ter čebeljega kruhka (Engel in sod., 2012; Anderson in sod., 2013).

Na koncu smo opravili še analizo ribosomskih sekvenc, ki smo jih pridobili z gojenjem bakterij iz vzorcev čebeljega kruhka. Bioinformacijska analiza sekvenc je pokazala, da vsi izolati izhajajo iz bakterijskega rodu *Bacillus*, kar je v skladu z raziskavo dr. Marthe Gilliam (1979b).

Kljub temu, da so se pri izvedbi molekularnih tehnik pojavljale težave, rezultati kažejo na to, da je v čebeljem kruhku prisotna bakterijska mikrobiota, ki se v strukturi razlikuje glede na posamezne satne celice v panjih kranjske čebele.

8 VIRI

- Ahn J.H., Hong I.P., Bok J.I., Kim B.Y., Song J., Weon H.Y. 2012. Pyrosequencing analysis of the bacterial communities in the guts of honey bees *Apis cerana* and *Apis mellifera* in Korea. *Journal of Microbiology*, 50, 5: 735-745
- Anderson K.E., Sheehan T.H., Eckholm B.J., Mott B.M., DeGrandi-Hoffman G. 2011. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58: 431-444
- Anderson K.E., Sheehan T.H., Mott B.M., Maes P., Snyder L., Schwan M.R., Walton A., Jones B.M., Corby-Harris V. 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE*, 8, 12: e83125, doi: 10.1371/journal.pone.0083125: 16 str.
- Anderson K.E., Carroll M.J., Sheehan T., Mott B.M., Maes P., Corby-Harris V. 2014. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. *Molecular Ecology*, 23: 5904-5917
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, 59, 1: 143-169
- Babendreier D., Joller D., Romeis J., Bigler F., Widmer F. 2006. Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology*, 59: 600-610
- Baltrusaitė V., Venskutonis P.R., Cekstertė V. 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101: 502-514
- Božič J. 1998. Lastnosti in življenje čebel. Življenje čebel. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 70-94
- Bokal L. (ur.). 2009. Čebelarski terminološki slovar. Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: e-knjiga
<http://bos.zrc-sazu.si/c/term/Cebelarski/index.html> (junij 2014)
- Brindza J., Grof J., Bacigalova K., Ferianc P., Toth D. 2010. Pollen microbial colonization and food safety. *Acta Chimica Slovaca*, 3, 1: 95-102
- Bryant M.P. 1972. Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 25: 1324-1328

- Campos M.G.R., Bogdanov S., Almeida-Muradian L.B., Szczesna T, Mancebo Y., Frigerio C., Ferreira F. 2008. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*, 47, 2: 156-163
- Casteel D.B. 1912. The behavior of the honey bee in pollen collecting. Washington, Government Printing Office: 36 str.
- Chelius M.K., Triplett E.W. 2001. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, 41, 3: 252-263
- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N.A., Quan P.L., Briese T., Hornig B., Geiser D.M., Martinson V., vanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Lipkin W.I. 2007. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318: 283-287
- Crotti E., Sansonno L., Prosdocimi E.M., Vacchini V., Hamdi C., Cherif A., Gonella E., Marzorati M., Ballo A. 2013. Microbial symbionts of honeybees: a promising tool to improve honeybee health. *New Biotechnology*, 30, 6: 716-722
- Dunham W.E. 1931. Hive temperatures for each hour of a day. *Ohio Journal of Science*, 31, 3: 181-188
- Endo A., Salminen S. 2013. Honeybees and beehives are rich sources for fructophilic lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 36: 444-448
- Engel P., Martinson V.G., Moran N.A. 2012. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 27: 11002-11007
- Engel P., Stepanauskas R., Moran N.A. 2014. Hidden diversity in honey bee gut symbionts detected by single-cell genomics. *PLoS Genetics* 10, 9: e1004596, doi: 10.1371/journal.pgen.1004596: 13 str.
- Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science, New Series*, 252, 5013: 1643-1651
- Evans J.D., Schwarz R.S. 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19, 12: 614-620
- Feas X., Vazquez-Tato M.P., Estevinho L., Seijas J.A., Iglesias A. 2012. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17: 8359-8377

- Fridman S., Izhaki I., Gerchman Y., Halpern M. 2012. Bacterial communities in floral nectar. *Environmental Microbiology Reports*, 4, 1: 97-104
- Gilliam M. 1979a. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10, 1: 43-53
- Gilliam M. 1979b. Microbiology of pollen and bee bread: the genus *Bacillus*. *Apidologie*, 10, 3: 269-274
- Gilliam M., Prest D.B., Lorenz B.J. 1989. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidology*, 20: 53-68
- Gilliam M. 1997. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*, 155: 1-10
- Handelsman J. 2002. Future trends in biocontrol. *Biological Control of Crop Diseases*, 19: 443-448
- Hanshew A.S., Mason C.J., Raffa K.F., Currie C.R. 2013. Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 95: 149-155
- Haydak M.H. 1970. Honey bee nutrition. *Annual Review of Entomology*, 15: 143-156
- Herbert E.W., Shimanuki H. Jr. 1978. Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. *Apidologie*, 9, 1: 33-40
- Human H., Nicolson S.W. 2006. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry*, 67: 1486-1492
- Javornik F., Kastelic L., Krajnc A., Mihelič J., Senegačnik E., Senegačnik J., Vidmar U. 1984. Čebelarstvo. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 377 str.
- Jeyaprakash A., Hoy M.A., Allsopp M.H. 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*, 84: 96-103
- Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezhuk Y., McGinnis S., Madden T.L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36: W5-W9, doi: 10.1093/nar/gkn201: 5 str.
- Kačaniová M., Pavličová S., Haščík P., Kociubinski G., Kmazovická V., Sudzina M., Sudzinová J., Fikselová M. 2009. Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 56, 3: 285-295

- Kozmus P., Smodiš MI., Nakrst M. 2011. Čebelarjenje za vsakogar. Ljubljana, Kmečki glas: 128 str.
- Loper G.M., Standifer L.N., Thompson M.J., Gilliam M. 1980. Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. I. - Fatty acids, sterols, vitamins and minerals. Apidologie, 11, 1: 63-73
- Martinson V.G., Danforth B.N., Minckley R.L., Rueppell O., Tingek S., Moran N.A. 2011. A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. Molecular Ecology, 20, 619-628
- Mattila H.R., Rios D., Walker-Sperling V.E., Roeselers G., Newton I.L.G. 2012. Characterization of the active microbiotas associated with honey bees reveals healthier and broader communities when colonies are genetically diverse. PLoS ONE, 7, 3: e32962, doi: 10.1371/journal.pone.0032962: 11 str.
- Meglič M. 1998. Čebelarska opravila. Jesenska opravila. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 278-289
- Mohr K.I., Tebbe C.C. 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (*Apoidea*) at an oilseed rape field. Environmental Microbiology, 8, 2: 258-272
- Moran N.A., Hansen A.K., Powell J.E., Sabree Z.L. 2012. Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. PLoS ONE, 7, 4: e36393, doi: 10.1371/journal.pone.0036393: 10 str.
- Muyzer G., Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59, 3: 695-700
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, 73: 127-141
- Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology, 148: 257-266
- Nagai T., Nagashima T., Myoda T., Inoue I. 2004. Preparation and functional properties of extracts from bee bread. Nahrung/Food, 48, 3: 226-229

- Neilson J.W., Jordan F.L., Maier R.M. 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 92, 3: 256-263
- Nixon H.L., Ribbands C.R. 1952. Food transmission within the honeybee community. *Proceedings of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 140, 898: 43-50
- Podrižnik B., Božič J. 2014. Maturation and stratification of antibacterial activity and total phenolic content in beebread honeycomb cell. *Journal of Apicultural Research*: 19 str. (sprejeto v objavo)
- Powell S.M., Chapman C.C., Bermudes M., Tamplin M.L. 2012. Use of a blocking primer allows selective amplification of bacterial DNA from microalgae cultures. *Journal of Microbiological Methods*, 90: 211-213
- Pozo M.I., Herrera C.M., Bazaga P. 2011. Species richness of yeast communities in floral nectar of southern Spanish plants. *Microbial Ecology*, 61, 1: 82-91
- Pusey P.L., Stockwell V.O., Mazzola M. 2009. Epiphytic bacteria and yeasts on apple blossoms and their potential as antagonists of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 99, 5: 571-81
- Redford A.J., Bowers R.M., Knight R., Linhart Y., Fierer N. 2010. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves. *Environmental Microbiology*, 12, 11: 2885-2893
- ReZKČ – Resolucija o zaščiti kranjske čebele. 2014. Uradni list Republike Slovenije, 14, 18: 2041-2047
- Rihar J. 1998. Čebelji pridelki. Cvetni prah. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 414-417
- Roulston T.H., Cane J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222: 187-209
- Serra-Bonvehi J., Escola-Jorda R. 1997. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 725-732
- Shade A., McManus P.S., Handelsman J. 2013. Unexpected diversity during community succession in the apple flower microbiome. *mBio*, 4, 2: e00602-12, doi: 10.1128/mBio.00602-12: 13 str.
- Snowdon J.A., Cliver D.O. 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, 31: 1-26

- Standifer L.N., McCaughey W.F., Dixon S.E., Gilliam M., Loper G.M. 1980. Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, amino acids and enzymes. Apidologie, 11: 163-171
- Stark J. 1998. Lastnsoti in življenje čebel. Klasifikacija čebel. V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 18-23
- Stockwell V.O., McLaughlin R.J., Henkels M.D., Loper J.E., Sugar D., Roberts R.G. 1999. Epiphytic colonization of pear stigmas and hypanthia by bacteria during primary bloom. Phytopathology, 89: 1162-1168
- Tadych M., Bergen M.S., Johnson-Cicalese J., Polashock J.J., Vorsa N., White J.F.Jr. 2012. Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to mature fruit: diversity and succession. Fungal Diversity, 54: 101-116
- Vasquez A., Olofsson T.C. 2009. The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. Journal of Apicultural Research and Bee World, 48, 3: 189-195
- Vasquez A., Forsgren E., Fries I., Paxton R.J., Flaberg E., Szekely L., Olofsson T.C. 2012. Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. PLoS ONE, 7, 3: e33188, doi: 10.1371/journal.pone.0033188: 9 str.
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1: 297-303
- 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
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173, 2: 697-703
- Winston M.L. 1991. The biology of the honeybee. Cambridge, Harvard University Press: 294 str.
- Yu Z., Morrison M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. BioTechniques, 36, 5: 808-812

ZAHVALA

Hvala mentorju prof. dr. Gorazdu Avguštinu za omogočeno delo v laboratoriju na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Biotehniške fakultete.

Hvala somentorju izr. prof. dr. Janku Božiču za idejo in problem magistrske naloge.

Hvala Luki za vse razlage, ideje, debate, pomoč, zavzetost, strpnost, skratka za reševanje premnogih problemov okoli magistrske naloge.

Hvala Ani, Andreji, Brigit, Maši, Robiju, Urši in celi rodiški bandi za vse čokolade in kavice in malice in prevoze in trojanske krofe in nasmehe in napotke in spodbude in druženja in pufre in epice in ... pomoč in podporo.

Hvala Blažu, Danielu, Gregorju, Manci, Primožu, Tadeju, Taji, Maji, Dimitriju, Nejcu, Barbiki, Jani, Anji, Janji, Marjeti, Diani, Aleksandru, Domnu, Nejki, Klari, Sari, ... vsem sošolcem in prijateljem, s katerimi sem preživela nepozabne študentske dni.

Ati in mami! Hvala, ker sta mi omogočila čudovit študij mikrobiologije in vse z njim povezane radosti.

Hvala vsem mojim, ki ste zame stiskali pesti in mi prav vedno stali ob strani.

PRILOGE

V prilogah A, B in C so razvrščeni vzorci, ki smo jih uporabljali pri nalogi. V prilogah A in B so prikazani t. i. testni vzorci; to so vzorci, ki smo jih uporabili na začetku analize (slika 7) ter vzorci, ki so bili namenjeni za optimizacijo nalog (slike 8, 9, 10, 11, 16, 17, 19 in 22). V prilogi C so prikazani vzorci, ki smo jih uporabili na koncu naloge za končno analizo strukture mikrobiote čebeljega kruhka (slike 21 in 25), ki so bili predhodno analizirani na vsebnost mlečne kisline. Nekatere vzorce smo uporabili v več poskusih, zato so v prilogah prikazani z oznako, ki se pojavi pri drugih slikah. Na slikah in v prilogah so vzorci označeni tako, da zaporedna številka označuje satno celico, iz katere je bil vzorčen čebelji kruhek, oznake 'sp', 'sr' in 'zg' označujejo spodnjo, srednjo in zgornjo tretjino čebeljega kruhka, oznaka 'cm' pomeni med, s katerim so čebele prekrile čebelji kruhek ter oznaka 'med' pomeni vzorčen med iz sosednje satne celice, ki je bila v celoti napolnjena z medom (slika 6). Vsi vzorci razen vzorcev z oznakami 1, 2 in 3 (na slikah 8, 9 in 19) so bili pripravljeni na Oddelku za biologijo (opisano v poglavju 3.2.1 Vzorci). Vzorce, ki teh oznak nimajo, smo pripravili sami po postopku, ki je prav tako opisan v poglavju 3.2.1 Vzorci.

Priloga A: Prikaz testnih vzorcev z oznakami na slikah, ki smo jih uporabili na začetku analize (slika 7)

OZNAKA VZORCA	METODA IZOLACIJE DNA	SLIKA	OZNAKA VZORCA PRI DRUGIH SLIKAH
1cm	A	slika 7	
2zg	A	slika 7	
3sr	A	slika 7	5sr, slika 10
4sp	A	slika 7	
5zg	A	slika 7	
6sr	A	slika 7	
7sp	A	slika 7	
8zg	A	slika 7	
9sr	A	slika 7	
10sp	A	slika 7	6sp, slika 10
11sr	A	slika 7	
12sr	A	slika 7	

Priloga B: Prikaz testnih vzorcev z oznakami na slikah, ki smo jih uporabili za optimizacijo metod (slike 8, 9, 10, 11, 16, 17, 19 in 22)

OZNAKA VZORCA	METODA IZOLACIJE DNA	SLIKA	OZNAKA VZORCA PRI DRUGIH SLIKAH
1	A, B, C, D, E, F, G, H	slike 8, 9 in 19	
2	A, B, C, D, E, F, G, H	slike 8, 9 in 19	
3	D	sliki 8 in 9	
4sp	D	sliki 8 in 9	
5sr	A	slika 10	3sr, slika 7
6sp	A	slika 10	10sp, slika 7
7sr	A	slika 10	
8sr	A, E	slike 11, 16 in 17	
8zg	A, E	sliki 11 in 17	
9sr	A, E	slike 11, 16, 17 in 22	
9zg	A, E	sliki 11 in 22	
9cm	A, E	sliki 11 in 22	
10sp	A	slika 11	
10sr	A	slika 11	12sr, slika 25
10zg	A	slika 11	
11sp	A	sliki 11 in 22	13sp, slika 25
11sr	A	slika 11	
11zg	A	slike 11, 16 in 17	

Priloga C: Prikaz vzorcev za končno analizo pri nalogi (sliki 21 in 25)

OZNAKA VZORCA	METODA IZOLACIJE DNA	SLIKA	OZNAKA VZORCA PRI DRUGIH SLIKAH
1sr	D	sliki 21 in 25	
1sp	D	sliki 21 in 25	
2sr	D	sliki 21 in 25	
2sp	D	sliki 21 in 25	
3zg	D	sliki 21 in 25	
3sr	D	sliki 21 in 25	
4sr	D	sliki 21 in 25	
4sp	D	sliki 21 in 25	
5zg	D	sliki 21 in 25	
5sr	D	sliki 21 in 25	
6zg	D	sliki 21 in 25	
7zg	D	sliki 21 in 25	
8zg	D	slika 25	
9zg	D	slika 25	
10med	D	slika 25	
11zg	D	slika 25	
12sr	A	slika 25	10sr, slika 11
13sp	A	slika 25	11sp, slika 11

Priloga D: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X1 z orodjem RDP SeqMatch

>1_X1
GGTCNCTTAGGCGGCTGGCTAAAAAGGTACCCCACCGACTCGGGTGTACAAACTCTCGTG
GTGTGACGGCGGTGTACAAGGCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTA
CTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCGAAGTGTAGAGAACGGTTTATG
AGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTGCAGCTTTGTACCGTCAATTGTAGCACGTGTAGCCCA
GGTCATAAGGGGCATGATGATTGACGTACCCCCACCTCCTCCGGTTGTACCCGGCAGTCA
CCTTAGAGTGCCAACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCCTCGTTGCGACTAA
CCCAACATCTCACGACACGGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCGAAGGA
GAAGCCCTATCTCTAGGGTTTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTCG
AATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTGAGTTTACGCCTTGCG
GCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTAATTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCTCTA
ACACTTAGCACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGC
TTTCGCGCCTCAGTGTCAAGACCAGAAAAGTCGCCTCGCCACTGGTGTCTCCATATCT
CTACGCATTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTCCTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTC
CAATGACCCCTCACGGTTGAGCGTGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGC
TTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG
TTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTGTTCTC
CCTAACAAACAGAGTTTACGACCCGAAAGCCTCATCACTCACCGCGCGTCCGTCAAGACT
TTCGTCCATTGCGGAANATCCCTACTG

Query Sequence: 1_X1, 1062 unique oligos

Match hit format:
short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - S000097776 - not_calculated 1.000 0971 Bacillus sp. 080702E; AF540983
 - S000364978 - not_calculated 1.000 0778 Bacillus sp. KN04F1; AB183775
 - S000364980 - not_calculated 1.000 0778 Bacillus sp. KN04H3; AB183777
 - S000364990 - not_calculated 1.000 0778 Bacillus sp. K7F4A6; AB183787
 - S000364991 - not_calculated 1.000 0778 Bacillus sp. K7H8; AB183788
 - S000365008 - not_calculated 1.000 0778 Bacillus sp. C1F1; AB183805
 - S000365014 - not_calculated 1.000 0778 Bacillus sp. IB02S3; AB183811
 - S000365016 - not_calculated 1.000 0778 Bacillus sp. IB02H1; AB183813
 - S000390079 - not_calculated 1.000 0499 Bacillus sp. C24; AF250402
 - S000407068 - not_calculated 1.000 0823 Bacillus cereus; CC-Pm1-2; AY315431
 - S000548328 - not_calculated 1.000 0504 denitrifying bacterium M1289; AY585315
 - S000636215 - not_calculated 1.000 0451 Bacillus sp. C18; DQ316053
 - S000636221 - not_calculated 1.000 0451 Bacillus sp. E13; DQ316059
 - S000646756 - not_calculated 1.000 0534 Bacillus sp. MN43; DQ336205
 - S000646803 - not_calculated 1.000 0554 Bacillus sp. MN38; DQ336252
 - S000653998 - not_calculated 1.000 0810 Bacillus sp. TD41; DQ462177
 - S000712036 - not_calculated 1.000 0773 Bacillus sp. C033; DQ643054
 - S000712052 - not_calculated 1.000 0446 Bacillus sp. C076; DQ643070
 - S000712053 - not_calculated 1.000 0585 Bacillus sp. C079; DQ643071
 - S000712081 - not_calculated 1.000 0589 Bacillus sp. CR26; DQ643100

Priloga E: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X2 z orodjem RDP SeqMatch

>2_X2

NNGGCTGGCTCCATAAAGGTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACACTCTCGTGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCCGATTACTAGCGATT
CCAGCTTCACGCAGTCAGTTGCAGACTGCGATCCGAACGTGAGAACAGATTGTGGGATTGGCT
AAACCTTGCCTCGCAGCCCTTGTCTGTCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGTATAAG
GGGCATGATGATTGACGTCATCCCCACCTCCTCCGGTTGTCAACCGGAGTCACCTAGAGTG
CCCAACTRAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGAAAGCCCTAT
CTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCA
CATGCTCCACCCTGTCGGGGCCCCGTCAATTCTTGAGTTCACTCTTGCACCGTACTCC
CCAGGGGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGAGCAGCACTAAGGGGGAAACCCCCAACACTTAGC
ACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTCGCTCCCCACGCTTCGCTCC
TCAGCGTCAGTTACAGACCAAGAGAGTCGCCTCGCCACTGGTGTCCCTCACATCTACGCATT
TCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCC
AATAATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG
GCTTCTGGTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTGCACTTGTCTCCCTAACAAACA
GAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCACGGCGTTGCTCCGTCAAGCTTCGTCATTG
CGGAAGATTCCCTACT

Query Sequence: 2_X2, 1052 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, **similarity score**, **S_ab score**, unique common oligomers and sequence full name. More [help is available](#).

Lineage:

+ rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
+ domain Bacteria (0/20/2754743)
+ phylum Firmicutes (0/20/755858)
+ class Bacilli (0/20/425108)
+ order Bacillales (0/20/242749)
+ family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
+ genus Bacillus (0/20/61671)
<input type="checkbox"/> S000358872 - not_calculated 1.000 1409 Bacillus sp. GSP46; AY505514
<input type="checkbox"/> S000385753 - not_calculated 1.000 1423 Bacillus pumilus ; TUT1009; AB098578
<input type="checkbox"/> S000389703 - not_calculated 1.000 0411 humic substances-degrading bacterium HS339; AF231418
<input type="checkbox"/> S000400855 - not_calculated 1.000 1388 Bacillus sp. ROO40B; AY188840
<input type="checkbox"/> S000417318 - not_calculated 1.000 1415 Bacillus altitudinis (T); type strain:41KF2b; AJ831842
<input type="checkbox"/> S000426017 - not_calculated 1.000 1435 Bacillus pumilus ; SKJH-21; AY741720
<input type="checkbox"/> S000499953 - not_calculated 1.000 1370 glacial ice bacterium G500K-16; AF479336
<input type="checkbox"/> S000531303 - not_calculated 1.000 1381 Bacillus pumilus ; AJ969932
<input type="checkbox"/> S000539232 - not_calculated 1.000 1351 Bacillaceae bacterium LA28; AF513457
<input type="checkbox"/> S000571487 - not_calculated 1.000 1416 Bacillus pumilus ; 12vg2a; AM062682
<input type="checkbox"/> S000635305 - not_calculated 1.000 1322 Bacillus pumilus ; B112; DQ289994
<input type="checkbox"/> S000635306 - not_calculated 1.000 1335 Bacillus pumilus ; B147; DQ289995
<input type="checkbox"/> S000635307 - not_calculated 1.000 1339 Bacillus pumilus ; B257; DQ289996
<input type="checkbox"/> S000646758 - not_calculated 1.000 0395 Bacillus sp. MN46; DQ336207
<input type="checkbox"/> S000646760 - not_calculated 1.000 0618 Bacillus sp. MN49; DQ336209
<input type="checkbox"/> S000646765 - not_calculated 1.000 0665 Bacillus sp. MN56; DQ336214
<input type="checkbox"/> S000646772 - not_calculated 1.000 0473 Bacillus sp. MN65; DQ336221
<input type="checkbox"/> S000646802 - not_calculated 1.000 0550 Bacillus sp. MN37; DQ336251
<input type="checkbox"/> S000652891 - not_calculated 1.000 1409 Bacillus pumilus ; OS-31.a; AM237349
<input type="checkbox"/> S000653976 - not_calculated 1.000 1356 Bacillus pumilus ; L18; DQ459877

Priloga F: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X3 z orodjem RDP SeqMatch

>3_X3

CNTAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACACTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGAC
AAGGCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACG
CAGTCGAGTTGCAGACTCGGATCCGAACCTGAGAACAGATTGTGGGATTGGCTAAACCTTGC
TCTCGCAGCCCTTGTCTGTCATTGACACGTGTTGACCCAGGTACATAAGGGGCATGATG
ATTGACGTACCCCCACCTCCTCCGGTTGTCACCGGCAGTCACCTAGAGTGCCCAACTRAA
TGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTGCCTCGTGCAGCTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAACCATGCACCACTGTCACTCTGCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTTAGGGTT
GTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCAATTAAACCACATGCTCCAC
CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTGAGTTCACTTGCACCGTACTCCCCAGGC
TGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGCGAAACCCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTT
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTCGCTCCCCACGCTTCGCTCAGCGTCAGT
TACAGACCAGAGAGTCGCCTCGCCACTGGTGTCCACATCTACGCATTCA
CGTGGAAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTCCAATGAC
GCCGGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCC
ACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCG
GGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTGCAC
CCGAAAACCTTCATCACTCACGC
CCGTTGCTCCGTAGGARTCTNGGC
CCGAGATTCCC
TACTGCTGCCTCCGTAGGARTCTNGGC

Query Sequence: 3_X3, 1057 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - █ S000087140 - not_calculated 1.000 1355 Bacillus pumilus; El-44-7; AJ494734
 - █ S000358872 - not_calculated 1.000 1409 Bacillus sp. GSP46; AY505514
 - █ S000385753 - not_calculated 1.000 1423 Bacillus pumilus; TUT1009; AB098578
 - █ S000389703 - not_calculated 1.000 0411 humic substances-degrading bacterium HS339; AF231418
 - █ S000399971 - not_calculated 1.000 1355 Bacillus sp. 71a; AY177362
 - █ S000400855 - not_calculated 1.000 1388 Bacillus sp. ROO40B; AY188840
 - █ S000417318 - not_calculated 1.000 1415 Bacillus altitudinis (T); type strain:41KF2b; AJ831842
 - █ S000426017 - not_calculated 1.000 1435 Bacillus pumilus; SKJH-21; AY741720
 - █ S000499953 - not_calculated 1.000 1370 glacial ice bacterium G500K-16; AF479336
 - █ S000531303 - not_calculated 1.000 1381 Bacillus pumilus; AJ969932
 - █ S000539232 - not_calculated 1.000 1351 Bacillaceae bacterium LA28; AF513457
 - █ S000571487 - not_calculated 1.000 1416 Bacillus pumilus; 12vg2a; AM062682
 - █ S000635305 - not_calculated 1.000 1322 Bacillus pumilus; B112; DQ289994
 - █ S000635306 - not_calculated 1.000 1335 Bacillus pumilus; B147; DQ289995
 - █ S000635307 - not_calculated 1.000 1339 Bacillus pumilus; B257; DQ289996
 - █ S000646758 - not_calculated 1.000 0395 Bacillus sp. MN46; DQ336207
 - █ S000646760 - not_calculated 1.000 0618 Bacillus sp. MN49; DQ336209
 - █ S000646765 - not_calculated 1.000 0665 Bacillus sp. MN56; DQ336214
 - █ S000646772 - not_calculated 1.000 0473 Bacillus sp. MN65; DQ336221
 - █ S000646802 - not_calculated 1.000 0550 Bacillus sp. MN37; DQ336251

Priloga G: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X4 z orodjem RDP SeqMatch

>4_X4

GGCTGGCTCCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACCTCTCGTGGTGTGACGGGC
GGTGTGACAAGGCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCC
AGCTTCACGCAGTCGAGTTGAGACTGCGATCCGAACAGTGGAAACAGATTGTGGGATTGGCTAA
ACCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTGTCTGTCCATTGTAGCACGTGTAGGCCAGGTATAAGGG
GCATGATGATTGACGTACATCCCCACCTCCTCCGGTTGTCACCGGCAGTCACCTAGAGTGC
CAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGACTTAACCCAACATCTCA
CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCTCCGAAGGGAAAGCCCTATCT
CTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTCTTCGCGITGCTCGAATTAAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTGAGTTGAGCTTCACTGCGACCGTACTCCCC
AGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGCGGAAACCCCCCTAACACTTAGCAC
TCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTCCTCCACGCTTCGCTCCTC
AGCGTCAGTTACAGACCAAGAGAGTCGCCTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTACGCATTTC
ACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTCCAATGACCCCT
CCCGGTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAA
TAATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC
TTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTGCACTTGTCTCCCTAACACAGA
GCTTACGATCCAAAACCTTCATCACTCACCGCGCGTGTCCGTCAAGACTTCGTCCATTGCG
GANNA

Query Sequence: 4_X4, 1048 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - S000025137 - not_calculated 1.000 0835 Bacillus pumilus; YM114B; AB035917
 - S000365020 - not_calculated 1.000 0777 Bacillus sp. IB02F4; AB183817
 - S000366990 - not_calculated 1.000 0548 Bacillus sp. 6-9; AJ781705
 - S000385753 - not_calculated 1.000 1423 Bacillus pumilus; TUT1009; AB098578
 - S000389703 - not_calculated 1.000 0411 humic substances-degrading bacterium HS339; AF231418
 - S000400855 - not_calculated 1.000 1388 Bacillus sp. ROO40B; AY188840
 - S000417318 - not_calculated 1.000 1415 Bacillus altitudinis (T); type strain:41KF2b; AJ831842
 - S000499953 - not_calculated 1.000 1370 glacial ice bacterium G500K-16; AF479336
 - S000539232 - not_calculated 1.000 1351 Bacillaceae bacterium LA28; AF513457
 - S000635306 - not_calculated 1.000 1335 Bacillus pumilus; B147; DQ289995
 - S000646758 - not_calculated 1.000 0395 Bacillus sp. MN46; DQ336207
 - S000646760 - not_calculated 1.000 0618 Bacillus sp. MN49; DQ336209
 - S000646765 - not_calculated 1.000 0665 Bacillus sp. MN56; DQ336214
 - S000646772 - not_calculated 1.000 0473 Bacillus sp. MN65; DQ336221
 - S000646802 - not_calculated 1.000 0550 Bacillus sp. MN37; DQ336251
 - S000653976 - not_calculated 1.000 1356 Bacillus pumilus; L18; DQ459877
 - S000712025 - not_calculated 1.000 0578 Bacillus sp. CO19; DQ643043
 - S000712042 - not_calculated 1.000 0568 Bacillus sp. CO45; DQ643060
 - S000712044 - not_calculated 1.000 0564 Bacillus sp. CO58; DQ643062
 - S000712064 - not_calculated 1.000 0545 Bacillus sp. CR75; DQ643083

Priloga H: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X5 z orodjem RDP SeqMatch

>5_X5

```
NGGCTGGCTCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACACTCGTGGTGTGACGGGC  
GGTGTGTACAAGGCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCAA  
AGCTTCACGCAGTCAGTTGCAAGACTCGCATCCGAACGAGAACAGATTGTGGGATTGGCTAA  
ACCTTGCGGTCTCGCAGCCCTTGTCTGTCCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGTATAAGGG  
GCATGATGATTGACGTACATCCCCACCTCCTCCGGTTGTACCGGCAGTCACCTAGAGTGC  
CAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGACTTAACCCAACATCTCA  
CGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCT  
CTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACACTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTCGAATTAAACCACA  
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTGTAGTTAGTCTGCGACCGTACTCCCC  
AGGCAGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGCGAAACCCCCCTAACACTTAGCAC  
TCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTCGCTCCTC  
AGCGTCAGTTACAGACCAAGAGACTCGCCTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTACGCATTTC  
ACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTCCAATGACCCCTC  
CCCGGTTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCCAA  
TAATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGC  
TTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTGCACTTGTCTCCCTAACAAACAGA  
GCTTACGATCCAAAACCTTCATCACTCACCGCGCGTTGCTCCGTACAGACNTTCGTCCATTGCG  
GAANATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGART
```

Query Sequence: 5_X5, 1062 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - 500025137 - not_calculated 1.000 0835 Bacillus pumilus; YM114B; AB035917
 - 5000365020 - not_calculated 1.000 0777 Bacillus sp. IB02F4; AB183817
 - 5000389703 - not_calculated 1.000 0411 humic substances-degrading bacterium HS339; AF231418
 - 5000646760 - not_calculated 1.000 0618 Bacillus sp. MN49; DQ336209
 - 5000712025 - not_calculated 1.000 0578 Bacillus sp. CO19; DQ643043
 - 5000712128 - not_calculated 1.000 0711 Bacillus sp. CU24; DQ643147
 - 5000712203 - not_calculated 1.000 0772 Bacillus sp. PB34; DQ643222
 - 5000712205 - not_calculated 1.000 0705 Bacillus sp. PB36; DQ643224
 - 5000722124 - not_calculated 1.000 0756 Bacillus sp. NCd-4; DQ784784
 - 5000776745 - not_calculated 1.000 0955 Bacillus sp. HZDC53; EF190372
 - 5000806413 - not_calculated 1.000 0713 Bacillus pumilus; DJM-2; EF378614
 - 5000892444 - not_calculated 1.000 0811 Bacillus sp. DJHH77; EF618719
 - 5000893219 - not_calculated 1.000 0727 Bacillus pumilus; DJHH52-1; EF647873
 - 5000893646 - not_calculated 1.000 0725 Bacillus sp. DJCJ40; EF694293
 - 5000893668 - not_calculated 1.000 0815 Bacillus sp. DJHH16; EF694315
 - 5000893671 - not_calculated 1.000 0521 Bacillus sp. DJWH5; EF694318
 - 5000897917 - not_calculated 1.000 1376 uncultured Bacillus sp.; 1; EU026426
 - 5000903222 - not_calculated 1.000 0838 Bacillus pumilus; DJH2; EU049515
 - 5000943301 - not_calculated 1.000 0678 Bacillus sp. DJH10; EU169527
 - 5000943323 - not_calculated 1.000 0762 Bacillus pumilus; CJHH6; EU169549

Priloga I: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X6 z orodjem RDP SeqMatch

>6_X6

GNGGCTGGCTCCAAAAGGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCCGATTACTACCGATT
CCAGCTTCACGCAGTCAGTTGCAGACTGCGATCCGAACGTGAGAACAGATTGTGGGATTGGCT
TAGCCTCGCGCTTCGCTGCCCTTGTCTGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGTACATAAG
GGGCATGATGATTGACGTACCCCCACCTCCTCCGGTTGTCACCGGCAGTCACCTAGAGTG
CCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGAAGCCCTA
TCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTCGAATTAAACC
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTGAGTTAGTCTGCGACCGTACTC
CCCAGGGAGTGCTTAATGCGTTGCTGCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCCTCTAACACTTAGC
ACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTCGCTCCCCACGCTTCGCGCC
TCAGCGTCAGTTACAGACCAAGAGAGTCGCCTCGCCACTGGTGTCCCTCACATCTACGCATT
TCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCCTTACGCC
AATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG
GCTTCTGGTAGGTACCGTCAAGGNNCGCCATTCAACGGTACTTGTCTTCCCTAACAAAC
AGANTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCCGTTGCTCCGTACACTTCGTCCATT
GCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCT

Query Sequence: 6_X6, 1061 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - S000391781 - not_calculated 1.000 0601 Bacillus sp. NW-Sp3Y; AF333558
 - S000736285 - not_calculated 1.000 0518 Bacillus sp. m2-13; DQ923186
 - S000736300 - not_calculated 1.000 0518 Bacillus sp. m9-51; DQ923201
 - S000775974 - not_calculated 1.000 0615 Bacillus licheniformis; EGU83; DQ768237
 - S000891796 - not_calculated 1.000 0404 Bacillus licheniformis; C32; DQ153970
 - S000891800 - not_calculated 1.000 0404 Bacillus licheniformis; C57; DQ153974
 - S000892591 - not_calculated 1.000 0543 Bacillus licheniformis; EGU8; EF633195
 - S001015290 - not_calculated 1.000 0616 Bacillus licheniformis; SRIPC1; EU429447
 - S001156719 - not_calculated 1.000 0791 Bacillus licheniformis; 414-2; FM199947
 - S001239743 - not_calculated 1.000 0620 Bacillus licheniformis; KNUC216; EF174520
 - S001328501 - not_calculated 1.000 0820 Bacillus sp. PS-99; JF489842
 - S001417546 - not_calculated 1.000 0437 Bacillus sp. K4; FJ887931
 - S001577833 - not_calculated 1.000 0809 Bacillus sp. BCCS 057; GQ352448
 - S001612908 - not_calculated 1.000 0848 Bacillus sp. BRAZ10; GQ867231
 - S001873803 - not_calculated 1.000 0701 Bacillus licheniformis; CPB-2; GU269630
 - S002153674 - not_calculated 1.000 0666 Bacillus licheniformis; BIOS PTK1; HM067974
 - S002202316 - not_calculated 1.000 0763 uncultured Bacillus sp.; Sec16; HM216909
 - S002202317 - not_calculated 1.000 0628 uncultured Bacillus sp.; Sec17; HM216910
 - S002228527 - not_calculated 1.000 0589 Bacillus sp. HuN-1; HM242291
 - S002447377 - not_calculated 1.000 0770 Bacillus sp. 6(2011); JF430795

Priloga J: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture X7 z orodjem RDP SeqMatch

>7_X7

GGCTGGCTCATAAAGGTACCTCACCGACTTCGGGTGTTNAAACTCTCGTGGTGTGACGGGGGG
TGTGTACAAGGCCGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCCGATTACTAGCGATTCCAG
CTTCACCGAGTCGAGTTGCAGACTCGAATCGAACAGATTATGGGATTGGCTAAC
CTTGCAGGCTCGCAGCCCTTGTCTGTCCATTGAGCACGTGTAGCCCAGGTATAAGGGGC
ATGATGATTGACGTATCCCCACCTCCTCCGGTTGTCACCGGCAGTCACCTAGAGTGCCCA
ACTAAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTGCAGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGCACTCTGCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCT
AGGGTTGTCAGAGGATGTCAGACCTGGTAAGGTTCTCGCAGTGTGCTTCGAATTAAACCACATG
CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTGAGTTGAGTCTGCGACCGTACTCCCCAG
GCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGCGGAAACCCCCCTAACACTTAGCACTCA
TCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGC
GTCAGTTACAGACCAAGAGAGTCGCCTTCGCCCCACTGGTGTGCTCCACATCTACGCATTTCACC
GCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTCCAATGACCCCTCCCC
GGTTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAA
TTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTC
TGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCGAGCAGTTACTCTCGCACTTGTCTCCCTAACAAACAGAGCTT
TACGATCCAAAACCTTCATCACTCACGCAGCGTGTGCTCCGTCAAGCTTCGTCATTGCGGAA
GATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGG

Query Sequence: 7_X7, 1061 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, **similarity score**, **S_ab score**, unique common oligomers and sequence full name. More [help is available](#).

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus *Bacillus* (0/20/61671)
 - 500140454 - not_calculated 1.000 0534 *Bacillus pumilus*; CC-Ca20; AY337586
 - 5000389703 - not_calculated 1.000 0411 humic substances-degrading bacterium HS339; AF231418
 - 5000407071 - not_calculated 1.000 0680 *Bacillus pumilus*; CC-2U5-1; AY315434
 - 5000610733 - not_calculated 1.000 0544 fuel tank bacterium S8; AY803244
 - 5000776227 - not_calculated 1.000 0493 *Bacillus* sp. sec2; EF051099
 - 5000902903 - not_calculated 1.000 0480 *Bacillus* sp. AP1M1; EU029116
 - 5001241573 - not_calculated 1.000 0816 *Bacillus pumilus*; BCCS 014; FJ422572
 - 5001263356 - not_calculated 1.000 0408 *Bacillus* sp. A-Se-N-11-1; AB478103
 - 5001264628 - not_calculated 1.000 0886 *Bacillus* sp. DCR_C12; FJ535579
 - 5001264639 - not_calculated 1.000 0895 *Bacillus* sp. DCR_F45; FJ535590
 - 5001328504 - not_calculated 1.000 0719 *Bacillus* sp. PS-115; FJ489845
 - 5001328510 - not_calculated 1.000 0815 *Bacillus* sp. PS-154; FJ489851
 - 5001602782 - not_calculated 1.000 0430 uncultured bacterium; DGGE gel band Dv508_W; GQ423616
 - 5002165694 - not_calculated 1.000 0527 *Bacillus pumilus*; CPR18; GU565570
 - 5002168120 - not_calculated 1.000 0543 *Bacillus pumilus*; ZH27; HM103347
 - 5002351573 - not_calculated 1.000 1346 *Bacillus pumilus*; AU582; HM585067
 - 5002351757 - not_calculated 1.000 0591 *Bacillus pumilus*; 2506hm 2.1.1; HQ262963
 - 5002444521 - not_calculated 1.000 0566 *Bacillus pumilus*; C54; HQ384387
 - 5002954714 - not_calculated 1.000 0620 bacterium JL1-45; JN118419
 - 5003292414 - not_calculated 1.000 0493 *Bacillus pumilus*; p62_C04; JQ829376

Priloga K: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture Y1 z orodjem RDP SeqMatch

>8_Y1
GGCTCCTAAAGGTTACCTCACCGACTCGGGTGTGCAAACACTCGTGGTGTGACGGGCGGTGT
GTACAAGGCCGGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCCGATTACTAGCGATTCCAGCTT
CACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTAGAGAACAGATTGTGGGATTGGCTAAACCTT
GCGGTCTCGCAGCCCTTGTCTGCCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGTATAAGGGCAT
GATGATTGACGTCACTCCCCACCTCCTCCGGTTGTACCGGCAGTCACCTAGAGTGCCAAC
TGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTGCCTCGTGCAGGACTTAACCCAACATCTCACGAC
ACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAG
GGTTGTCAGAGGATGTCAGACACTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCT
CCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCTTGAGTTCTAGTCTGCGACCGTACTCCCAGGC
GGAGTGCTTAATGCGTAGCTGCAGCACTAAGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATC
GTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTCGCTCCTCAGCGT
CAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTCGCCACTGGTGTCCACATCTACGCATTCAACCGC
TACACGTGAAATCCACTCTCTCTGCACTCAAGTTCCAGTTCCAATGACCCCTCCCCGG
TTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACGCCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATT
CCGGACAACGCTGCCACCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCT
GGTTAGGTACCGTCAAGGTCAAGCAGTTACTCTGCACTTGTCTCCCTAACAAACAGANCTT
ACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCCGTTGCTCCGTAGACNTTCGTCCATTGCGGAAG
ATTCCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAATCTGGG

Query Sequence: 8_Y1, 1065 unique oligos

Match hit format:
short ID, orientation, similarity score, 5_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - S000025137 - not_calculated 1.000 0835 Bacillus pumilus; YM114B; AB035917
 - S000365020 - not_calculated 1.000 0777 Bacillus sp. IB02F4; AB183817
 - S000389703 - not_calculated 1.000 0411 humic substances-degrading bacterium HS339; AF231418
 - S001264641 - not_calculated 1.000 0885 Bacillus sp. DCR_RI06-31; FJ535592
 - S001264783 - not_calculated 1.000 0598 Bacillus pumilus; FJ538596
 - S001328503 - not_calculated 1.000 0816 Bacillus sp. PS-111; FJ489844
 - S001328505 - not_calculated 1.000 0816 Bacillus sp. PS-120; FJ489846
 - S001328511 - not_calculated 1.000 0817 Bacillus sp. PS-156; FJ489852
 - S001328515 - not_calculated 1.000 0818 Bacillus sp. PS-226; FJ489856
 - S001328519 - not_calculated 1.000 0816 Bacillus sp. PS-236; FJ489860
 - S001328520 - not_calculated 1.000 0804 Bacillus sp. PS-244; FJ489861
 - S001328523 - not_calculated 1.000 0793 Bacillus sp. PS-255; FJ489864
 - S002232612 - not_calculated 1.000 0547 Bacillus pumilus; OKB2; HM748476
 - S002232616 - not_calculated 1.000 0533 Bacillus pumilus; LC8; HM748480
 - S002351750 - not_calculated 1.000 0592 Bacillus pumilus; 103.hm 2.1.1; HQ262956
 - S002351752 - not_calculated 1.000 0592 Bacillus pumilus; 103.ht.2.1.2; HQ262958
 - S002351763 - not_calculated 1.000 0592 Bacillus pumilus; A2076 3.2.1; HQ262969
 - S002351764 - not_calculated 1.000 0592 Bacillus pumilus; A2076 5.1.1; HQ262970
 - S002351783 - not_calculated 1.000 0574 Bacillus pumilus; CUR3 2.1.1; HQ262989
 - S002351790 - not_calculated 1.000 0592 Bacillus pumilus; EB1922 1.1.1; HQ262996

Priloga L: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture Y2 z orodjem RDP SeqMatch

>9_Y2

CGGCTGGCTCCATAAAGGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACACTCTCGTGGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCGGAACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCCGATTACTAGCGATT
CCAGCTTCACGCAGTCAGTTGCAGACTGCGATCCGAACGTGAGAACAGATTGTGGGATTGGCT
AAACCTTGCCTCGCAGCCCTTGTCTGTCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGTACATAG
GGGCATGATGATTGACGTCATCCCCACCTCCTCCGGTTGTCACCGGCAGTCACCTAGAGTG
CCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGAAAGCCCTAT
CTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCA
CATGCTCCACCCTGTCGGGGCCCCGTCAATTCTTGAGTTCACTCTTGCACCGTACTCC
CCAGGGGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGACGACTAAGGGGGAAACCCCCCTAACACTTAGC
ACTCATCGTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTCGCTCCCCACGCTTCGCTCC
TCAGCGTCAGTTACAGACCAAGAGAGTCGCCTCGCCACTGGTGTCCCTCACATCTACGCATT
TCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTGCACTCAAGTTCCCAGTTCCAATGACCC
TCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCC
AATAATTCCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTG
GCTTCTGGTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTGCACTTGTCTCCCTAACACA
GAGCTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCACGGCGTTGCTCCGTACAGCTTCGTCATTG
CGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCGTAGGAAT

Query Sequence: 9_Y2, 1078 unique oligos

Match hit format:
short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. [More help is available.](#)

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - S000025137 - not_calculated 1.000 0835 Bacillus pumilus; YM114B; AB035917
 - S000365020 - not_calculated 1.000 0777 Bacillus sp. IBO2F4; AB183817
 - S000389703 - not_calculated 1.000 0411 humic substances-degrading bacterium H5339; AF231418
 - S000646758 - not_calculated 1.000 0395 Bacillus sp. MN46; DQ336207
 - S000646760 - not_calculated 1.000 0618 Bacillus sp. MN49; DQ336209
 - S000646765 - not_calculated 1.000 0665 Bacillus sp. MN56; DQ336214
 - S000646772 - not_calculated 1.000 0473 Bacillus sp. MN65; DQ336221
 - S000646802 - not_calculated 1.000 0550 Bacillus sp. MN37; DQ336251
 - S000712025 - not_calculated 1.000 0578 Bacillus sp. CO19; DQ643043
 - S000712042 - not_calculated 1.000 0568 Bacillus sp. CO45; DQ643060
 - S000712044 - not_calculated 1.000 0564 Bacillus sp. CO58; DQ643062
 - S000712064 - not_calculated 1.000 0545 Bacillus sp. CR75; DQ643083
 - S000712083 - not_calculated 1.000 0705 Bacillus sp. CR28; DQ643102
 - S000712111 - not_calculated 1.000 0483 Bacillus sp. CR65; DQ643130
 - S000712112 - not_calculated 1.000 0646 Bacillus sp. CR66; DQ643131
 - S000712114 - not_calculated 1.000 0483 Bacillus sp. CR68; DQ643133
 - S000712122 - not_calculated 1.000 0636 Bacillus sp. CU15; DQ643141
 - S000712125 - not_calculated 1.000 0674 Bacillus sp. CU20; DQ643144
 - S000712128 - not_calculated 1.000 0711 Bacillus sp. CU24; DQ643147
 - S000712147 - not_calculated 1.000 0656 Bacillus sp. CU48; DQ643166

Priloga M: Sekvenca in rezultati poizvedbe o taksonomski uvrstitvi pridobljene sekvence iz čiste kulture Y3 z orodjem RDP SeqMatch

>10_Y3

GGTTANCCCACCGACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTACAAGGCC
CGGGAACGTATTCAACCGCGCATGCTGATCCGCATTACTAGCGATTCCAGCTTCATGTAGGCC
AGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACGGTTTATGAGATTAGCTCACCTCGGGCTTGC
AGCTCTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTAGCCCAGGTATAAGGGCATGATGATTGA
CGTCATCCCCACCTCCTCCGGTTGTACCCGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTTAATGATGG
CAACTAAGATCAAGGGTTCGCGCTCGTTGCGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGAC
GACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCTCCCAGGAGAACGCCATCTAGGGTTTCAGA
GGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCAATTAAACCACATGCTCACCGCTTGT
GCGGGCCCCGTCATTCTTGAGTTTACGCCCTGCCGACTCCCCAGGCAGTGCTTA
ATGCGTTAACCTCAGCACTAAAGGGCGAAACCCCTCAACACTTAGCACTCATCGTTACGCC
TGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACCGCTTCCGCCTCAGTGTCAAGTACAGA
CCAGAAAGTCGCCCTCGCCACTGGTGTCCATATCTCACGCATTACCGCTACACATGGA
ATTCCACTTCCTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTCCAATGACCCCTCACGGTTGAGCCGTG
GGCTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAACG
CTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTACC
GTCAAGGTGCCAGCTATTCAACTAGCACTTGTCTCCCTAACAAACAGAGTTTACGACCCGA
AAGCCTTCATCACTCACGCCGTTGCTCCGTAGACTTCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACT
GCTGCCCTCCGTAGG

Query Sequence: 10_Y3, 1058 unique oligos

Match hit format:

short ID, orientation, similarity score, S_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More help is available.

Lineage:

- + rootrank Root (0/20/2998217) (selected/match/total RDP sequences)
- + domain Bacteria (0/20/2754743)
- + phylum Firmicutes (0/20/755858)
- + class Bacilli (0/20/425108)
- + order Bacillales (0/20/242749)
- + family Bacillaceae 1 (0/20/72509)
- + genus Bacillus (0/20/61671)
 - S000000601 - not_calculated 1.000 1398 Bacillus thuringiensis; WS 261; Z84584
 - S000004484 - not_calculated 1.000 1388 Bacillus sp. AH 540; AF290557
 - S000006577 - not_calculated 1.000 1395 Bacillus thuringiensis; WS 2626; Z84588
 - S000006757 - not_calculated 1.000 1398 Bacillus cereus; AH 527; AF290555
 - S000007475 - not_calculated 1.000 1397 Bacillus thuringiensis; ATCC33679; AF290549
 - S000007738 - not_calculated 1.000 1428 Bacillus thuringiensis; WS 2614; Z84593
 - S000013815 - not_calculated 1.000 1418 Bacillus thuringiensis; AF160221
 - S000014039 - not_calculated 1.000 1397 Bacillus cereus; ATCC43881; AF290550
 - S000014773 - not_calculated 1.000 1400 Bacillus sp. AH 533; AF290556
 - S000015508 - not_calculated 1.000 1404 Bacillus cereus; ATCC14579; AF290547
 - S000015866 - not_calculated 1.000 1404 Bacillus cereus; ATCC31293; AF290548
 - S000021267 - not_calculated 1.000 1406 Bacillus thuringiensis; ATCC10792; AF290545
 - S000021421 - not_calculated 1.000 1404 Bacillus cereus; ATCC11778; AF290546
 - S000088307 - not_calculated 1.000 1427 Bacillus cereus biovar toyoi; CNCM I-1012/NCIB 40112; AJ310100
 - S000089138 - not_calculated 1.000 1417 Bacillus cereus; ATCC 14893 = CIP 5832; AJ310098
 - S000097776 - not_calculated 1.000 0971 Bacillus sp. 080702E; AF540983
 - S000124893 - not_calculated 1.000 1433 Bacillus sp. CJ11076; AF500212
 - S000139789 - not_calculated 1.000 1430 Bacillus cereus; F 528/94; AJ577291
 - S000140084 - not_calculated 1.000 1430 Bacillus cereus; B 204; AJ577292
 - S000255336 - not_calculated 1.000 0571 Bacillus sp. ICS20418; AY456216